

THESIS

MÜNICH

1963

Untersuchungen über einige
mikrobielle Vorgänge
bei der Rohwurstherstellung

Beeinflussung von Muskelfarbstoff, Muskeleiweiß und Fett
durch Rohwurstkeime

Robert Wellhäuser

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

Aus dem Institut für Nahrungsmittelkunde
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. L. Kotter

UNTERSUCHUNGEN ÜBER
EINIGE MIKROBIELLE VORGÄNGE
BEI DER ROHWURSTHERSTELLUNG

Beeinflussung von Muskelfarbstoff, Muskeleiweiß
und Fett durch Rohwurstkeime

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Robert Wellhäuser

aus

Ravensburg

München 1963

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. K. Ullrich

Referent: Prof. Dr. L. Kotter

Tag der mündlichen Prüfung: 22.2.63

In Dankbarkeit meinen Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. Einleitung	1
B. Literatur	2
I. Umrötung und ihre mikrobielle Beeinflussung	2
1. Allgemeines über den Aufbau von Myoglobin und grundsätzliche Unterschiede gegenüber Hämoglobin	2
2. Sauerstoffverbindungen des Myoglobins	3
3. Die Bedeutung von Pökelfstoffen und Bakterien für die Umrötung	6
4. Pökelhilfsstoffe und ihre Bedeutung für die Umrötung	12
5. Umrötung während der Rohwurstreifung	14
II. Einwirkung von Keimen auf Rohwurstreifung	17
1. Allgemeines zur proteolytischen Wirksamkeit von Keimen und deren Verhalten gegenüber Aminosäuren	17
2. Einfluß proteolytischer Keime bei der Rohwurstherstellung	18
III. Abbau von Fetten durch mikrobielle Fermente	23
1. Allgemeines zur lipolytischen Aktivität von Keimen	23
2. Literaturangaben über die lipolytische Tätigkeit von Keimen in Rohwürsten und die hierdurch erfolgende Aromabildung	25

	Seite
C. Eigene Untersuchungen	29
I. Zur Beeinflussung der Umrötung von Rohwürsten durch Keime	29
II. Versuche über die proteolytische Aktivität von Rohwurstkeimen	32
III. Untersuchungen über lipolytische Aktivität von Rohwurstkeimen und deren Aromabildung auf fetthaltigen Nährböden	34
D. Diskussion	39
E. Zusammenfassung	42
F. Literaturverzeichnis	43
Lebenslauf	59

A. EINLEITUNG

Bei der Rohwurstreifung laufen biologische, chemische und physikalische Vorgänge in bestimmten Rhythmen ab, die einerseits leicht gestört, andererseits aber doch gelenkt werden können. Die meisten Vorgänge sind im wesentlichen mikrobiologisch bestimmt.

Mir war empfohlen worden, im Rahmen der vorliegenden Arbeit bevorzugt die Einwirkung von Keimen auf Muskelfarbstoff, Fleischiweiß und Fett zu studieren und dabei auch die Aromabildung zu berücksichtigen.

B. LITERATUR

I. Umrötung und ihre mikrobielle Beeinflussung

1. Allgemeines über den Aufbau von Myoglobin und grundsätzliche Unterschiede gegenüber Hämoglobin

Die rote Farbe des ausgebluteten Muskels wird überwiegend durch das Myoglobin bestimmt. So stellten Shenk, Hall und King (106) fest, daß die "Pigmente" des Rindermuskels zu 89,5 - 96,7 % aus Myoglobin und zu 3,3 - 10,5 % aus Hämoglobin bestehen; in 100 g frischer Muskulatur wurden 332 - 454 mg Myoglobin ermittelt. Ginger und Mitarbeiter (28) fanden in 100 g Rindermuskulatur durchschnittlich 370 mg Myoglobin, in hellen Schweinemuskeln 79 mg und in dunklen 144 mg.

Theorell (115) stellte als erster Myoglobin kristallin dar und wies auf Unterschiede hinsichtlich Sedimentierungskonstante, p_H -Stabilität und isoelektrischem Punkt gegenüber Hämoglobin hin. Millikan (87) fand in Muskeln mit starker Aktivität besonders reichlich "Muskelhämoglobin". Seine Konzentration in der Muskulatur junger Tiere ist zunächst gering, nimmt dann aber mit der Erhöhung der Aktivität der Muskeln im Laufe des Wachstums zu. Myoglobin ("ein echtes Hämoglobin") unterscheidet sich von dem Hämoglobin des Blutes in folgenden Punkten:

1. Seine Absorptionsbande sind nach dem roten Wellenbereich hin verschoben;
2. es zeigt starke Affinität zu Sauerstoff und hat eine hyperbolische Dissoziationskurve;
3. seine Affinität ist zu CO relativ geringer als zu O_2 ;
4. 1 Molekül Myoglobin enthält nur 1 Eisenatom;
5. der "Bohr-Effekt" ist sehr gering.

Nach Theorell (117) ist die Wirksamkeit von Hämoglobinen, Katalasen, Cytochromen und Peroxydasen an ein oder mehrere Eisenatome gebunden. Wird das Eisenatom der prosthetischen Gruppe durch ein anderes Metall

ersetzt, so geht die spezifische Wirkung der genannten Hämoproteide verloren. Das Eisenatom befindet sich im Zentrum eines Porphyrin-Ringes, dessen vier zentrale N-Atome an 2 Haupt- und 2 Nebenvalezen des Eisens gebunden sind. Aller Wahrscheinlichkeit nach ist an eine oder beide der verbleibenden freien Valenzen die Proteinkomponente angelagert. Die verschiedenen Wirkungsweisen dieser Hämoproteide müssen - da gleiche prosthetische Gruppen vorliegen - in den unterschiedlichen Eiweißkomponenten begründet sein. Die bisherige Forschung auf diesem Gebiet habe außerdem gezeigt, daß Eiweißgruppen, welche an das Fe-Atom gebunden sind, dieses stark beeinflussen können. Moleküle, die an den Seitenketten der Porphyrine oder überhaupt in der Nähe des Eisenatoms gelagert sind, könnten seine Reaktionsweise ebenfalls beeinflussen.

Die prosthetische Gruppe wird, je nachdem ob das Eisen in 2- oder 3-wertiger Form vorliegt, als Häm oder Hämatin bezeichnet. Clark und Mitarbeiter (zit. nach Theorell (117)) haben festgestellt, daß das Häm nach Abspaltung der Globinkomponente 2 Moleküle H_2O bzw. das Hämatin 1 Molekül H_2O und 1 Hydroxylgruppe binden können. Die Wassermoleküle in beiden Verbindungen sind leicht durch Stickstoffbasen, wie Pyridin, Nikotin, Pikolin oder Histidin zu ersetzen und ergeben dann Hämochromogene bzw. Hämichromogene.

2. Sauerstoffverbindungen des Myoglobins

Watts (124) hat das Schrifttum über die natürlichen Farbstoffe und deren Oxydationsprodukte in Fleisch zusammengefaßt. An nativen Blut- und Muskelfarbstoff kann Sauerstoff angelagert werden (Oxygenation), ohne daß es zur Oxydation kommt. Die hellrote Farbe der Oberfläche von unverpackten Fleischstücken wird überwiegend durch oxygeniertes Myoglobin bedingt, die purpurne Farbe durch den reduzierten Farbstoff. Bei oxydativer Anlagerung von Sauerstoff gibt das Eisenion ein Elektron ab und geht in den 3-wertigen Zustand über. Mit dem Ablauf dieser Reaktion erfolgt ein Farbumschlag von rot bzw. purpur nach braun. Die Oxydation des Myoglobins durch molekularen Sauerstoff erfolgt nach Kiese und Kaeske (67) 12 - 14 mal schneller als jene des Hämoglobins. Starke oxydative Vorgänge können den Porphyrinring sprengen; es entstehen grün oder grau gefärbte Abbauprodukte (124).

Brown und Tappel (12) berichten, daß als erste Stufe der Oxydation eine Desoxygenierung von Oxymyoglobin erfolgt. Diese Reaktion ist vom Sauerstoffpartialdruck abhängig: Bei hoher O_2 -Spannung stellt Oxymyoglobin eine ziemlich beständige Verbindung dar, außerdem wird hierbei Myoglobin in Oxymyoglobin überführt. Die stärkste Umwandlungsrate von Myoglobin zu Metmyoglobin war bei $0^\circ C$ und einer O_2 -Spannung von 4 mm zu beobachten. Im Innern des Fleisches wird der Sauerstoff von respiratorischen Fermenten aufgebraucht (Succinoxydase), und es bildet sich Myoglobin, das oxydativen Einflüssen gegenüber sehr labil ist.

Die Metmyoglobinbildung wird auch durch den p_H -Wert beeinflusst. Brooks (11) sah einen raschen Farbwechsel von rot nach braun bei Fleisch, das in Salzlake gebracht wurde. Diese Verfärbung führt er in erster Linie auf die durch das Salz bedingte p_H -Senkung zurück und nur zu einem kleinen Teil auf die direkte Wirkung des Salzes. Es sollen die Ionen des Kochsalzes in die oberflächlichen Gewebeschichten eindringen und den p_H -Wert der dort anwesenden Puffer senken. Bei genügend hoher NaCl-Konzentration steigt die Oxydationsrate von Myoglobin auf das 4 - 5 fache an. Watts und Lehmann (126) beobachteten Braun- oder Grünverfärbungen nach Zugabe von Salz besonders deutlich an gefrorenem Fleisch. Viele Autoren führten dies auf die katalytische Wirkung von Salz bei der Oxydation von Hämoglobin durch ungesättigte Fettsäuren zurück, jedoch konnte eine solche spezifische Beeinflussung nicht festgestellt werden. Offenbar beschleunigt Kochsalz die Oxydationsrate sowohl von Hämoglobin als auch von ungesättigten Fettsäuren.

Erfolgt eine Denaturation der Globinkomponente, so geht die Fähigkeit der Sauerstoffanlagerung verloren, und der Muskelfarbstoff wird gegenüber einer Oxydation sehr anfällig (124). Besonders auffällig ist dieser Farbwechsel beim Erhitzen von frischem Fleisch, das nach dem Kochen einen grau-braunen Farbton aufweist.

Die Reduktion unerwünschter Verfärbungen des Muskelfleisches und deren Vorbeugung durch Zusatz reduzierender Mittel sind ein besonderes Anliegen der Fleischwirtschaft. Das medizinische Schrifttum hat sich schon seit längerem mit der Reduktion von Methämoglobin (zur Bekämpfung der **Methämoglobinämie**) befaßt. Bei Durchsicht dieser Literaturbesprechung sollen allerdings nur Arbeiten berücksichtigt werden, die gewisse Rückschlüsse auf analoge Vorgänge in der Muskulatur zulassen.

Methämoglobin ist in geringen Mengen ständig im Blut zu finden, und ohne fortlaufende Reduktion würde es ständig ansteigen. Erythrozyten, die Methämoglobin enthalten, oxydieren Glukose, wie Warburg und Christiansen (122) feststellten; dabei wird Methämoglobin reduziert. In Hämolysaten wird Methämoglobin nur bei Zusatz von aktivierter Glukose (Hexose-Mono-Phosphorsäure) reduziert. Eine weitere Voraussetzung für die Reduktion ist die Anwesenheit eines Fermentes, das Warburg und Mitarbeiter (123) darstellen konnten. Auch Kiese (66) prüfte Stoffe, die Methämoglobin reduzieren können. Schnelle Reduktion erfolgt durch Gewebeprei und Bakterien; ferner durch Glycerinaldehyd, Ascorbinsäure, Cystein, Fruktose, Glukose und Laktat. In Hämolysaten reduzierten Glukose und Fruktose nicht mehr, dagegen gelang die Reduktion mittels Hexosemono- und Hexosediphosphat, allerdings nur in Anwesenheit eines aus 3 Komponenten zusammengesetzten Fermentensystems. Was die Wirksamkeit der einzelnen Stoffe anbetrifft, so übertrifft Laktat schon in geringer Konzentration die Wirkung gleicher Glukosekonzentrationen. Sind Laktat und Glukose gleichzeitig vorhanden, so ist die Reduktionsgeschwindigkeit höher als bei den einzelnen Komponenten. Die Reduktion durch Ascorbinsäure verlief schneller als diejenige durch Glycerinaldehyd.

Gutmann und Mitarbeiter (41) kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Jedoch beobachteten sie in Hämolysaten die Reduktion von Methämoglobin bei Zusatz von Laktat oder Hexosemonophosphat nur dann, wenn während der Hämolyse Nikotinamid vorhanden war. Nikotinamid hemmt nämlich die Pyridin-Nukleotid-Hydrolyse. Der Zusatz von reduziertem Diphosphorpyridinnukleotid (DPN-H_2) aus Hefen bewirkte eine schnelle Reduktion des Methämoglobins. DPN in seiner oxydierten Form erwies sich als unwirksam. Die Reduktionswirkung von Glukose entfaltete sich nur bei intakten Erythrozyten.

Brown und Tappel (12) gingen dieser Wirkungsweise nach und kamen zu dem Schluß, daß Nikotinamid mit Myoglobin keine Verbindung in Form von Nikotinamid-Myoglobin eingeht, wenngleich es auch Oxy-myoglobin vor einer Oxydation schützt: Einmal entfalte es in einer reinen Methämoglobininlösung keine reduzierende Wirkung und dann ergebe ein Zusatz zu einer Oxy-myoglobininlösung keine Änderung des Absorptionsspektrums von Oxy-myoglobin.

Für frisches Fleisch empfehlen Watts und Lehmann (126) die Behandlung der Fleischoberfläche mit einer 0,02 - 0,1 %igen Ascorbinsäurelösung. Gekühltes Fleisch bekommt dadurch eine hellere Oberflächenfarbe, ausserdem hält sich die ursprünglich hellrote Farbe länger. Höhere Konzentrationen rufen Grünfärbung hervor. Bei Fleisch, das eingefroren werden soll, wird von einem Ascorbinsäurezusatz abgeraten, da ebenfalls grünlliche Verfärbungen auftreten, die auf die Bildung von Choleglobin zurückgeführt werden.

3. Die Bedeutung von Pökelfstoffen und Bakterien für die Umrötung

Pökelwaren erhalten ihre charakteristischen Eigenschaften durch die Einwirkung der eigentlichen Pökelfstoffe (Nitrate, Nitrite) auf das Fleisch. Nach allgemeiner Auffassung erfolgt der Abbau von Nitraten zu Nitrit bei Pökellung und Reifung von Fleischwaren mikrobiell. Gelegentlich wird jedoch auch die Ansicht vertreten, daß die Nitratreduktion im Fleisch auch ohne Keime erfolgen könne. Nach Bernheim und Dixon (5) ist die Muskulatur von Ratten und Meerschweinchen in der Lage, unter sterilen Kautelen Nitrat zu reduzieren, nicht jedoch diejenige von Rind, Schaf, Schwein, Kaninchen, Hund und Huhn. Dagegen reduzieren die Lebern aller genannten Tiere Nitrat sehr rasch: Nitrat wird durch das Lebergewebe der Ratte etwa 5 - 10 mal schneller abgebaut als durch die Muskulatur. Fischbach (25) berichtet, daß auch die Salpeterpökellung unter sterilen Bedingungen möglich ist. Die Reduktion von Nitrat kann durch originäre Reduktasen des Fleisches unter den berichteten Versuchsbedingungen allerdings nur dann erfolgen, wenn Rind- und Schweinefleisch kurz nach der Schlachtung (unter sterilen Kautelen) in Nitratlösung getaucht werden. In Rindfleisch sind originäre Reduktasen in stärkerem Ausmaße vorhanden als in Schweinefleisch. Die Entstehung der Pökelröte erfolgte jedoch in allen Versuchen schneller, sobald die Lake Bakterien enthielt. Nach Terplan (114) sind entgegen der bisher vorherrschenden Meinung, daß die für die Umrötung erforderliche Nitratreduktion ausschließlich durch Keime erfolgt, auch hitzelabile Bestandteile des Fleisches in gewissem Umfang dazu befähigt.

Zobell (132) stellte bei annähernd 600 Bakterienstämmen ein konstantes Nitratreduktionsvermögen fest. Von sehr vielen Stämmen wird das entstandene Nitrit sofort weiter abgebaut, so daß bei einer chemischen Analyse

kein Nitrit vorhanden sein kann, obwohl Nitrat reduziert wurde. Er empfiehlt daher, bei negativem Nitritnachweis eine Nitratbestimmung durchzuführen. Eddy (22) isolierte von verschiedenen Fleischwaren und Pökellaken 114 Mikrokokkenstämme, von denen 23 weder Nitrat noch Nitrit reduzierten; 74 reduzierten Nitrat zu Nitrit. Durch 45 von diesen Stämmen erfolgte ein weiterer Abbau des Nitrites, wobei 17 Stämme Nitrit und 28 Stämme Nitrat schneller reduzierten.

Jensen (52) sieht eine wesentliche Bedeutung des Salpeters für die Pökelung auch in der Schaffung aerober Verhältnisse im Fleischinnern, wodurch Anaerobier gehemmt werden. Dadurch sollen Fäulnisprozesse, die ebenfalls unter anaeroben Bedingungen ablaufen, unterbunden werden. Außerdem besteht die Möglichkeit, daß sich aerobe Keime bei Anwesenheit von Salpeter unter Luftabschluß entwickeln können.

In diesem Zusammenhang sei noch die keimhemmende Wirkung des Nitrits erwähnt, auf die jedoch hier nicht näher einzugehen ist. Terplan (114) hat das Schrifttum in dieser Hinsicht umfassend referiert.

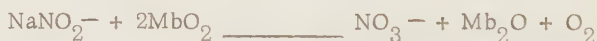
Über Reaktionen von Nitrit und Stickoxyd mit Hämoglobin wurde oft berichtet. Hier sollen nur diejenigen Arbeiten berücksichtigt werden, die Rückschlüsse auf Umrötungsvorgänge in Fleischwaren zulassen.

Anson und Mirsky (1) fanden, daß Stickoxyd den Sauerstoff im Oxyhämoglobin und das Kohlenmonoxyd im Kohlenmonoxydhämoglobin verdrängt. Haurowitz (45) stellte fest, daß sich Stickoxyd bei vollkommenen Sauerstoffausschluß sofort mit Hämoglobin zu Stickoxydhämoglobin verbindet. Nach Untersuchungen von Keilin und Hartree (60) bildet Metmyoglobin mit NO eine leicht reversible Verbindung, die sehr labil ist und nach einiger Zeit zu Nitrosohämoglobin reduziert wird.

Barnard (2) untersuchte die Reaktion von Nitrit mit Hämoglobinderivaten. Aufgrund potentiometrischer Ergebnisse soll sich Nitrit mit dem 3-wertigen Eisen von Methämoglobin verbinden und seine oxydierende Wirkung vermindern. Mit den Ferrohämoglobinderivaten erfolge keine Verbindung. Nitrit soll die Globinkomponente denaturieren.

Brooks (9) stellte fest, daß bei Anwesenheit eines Reduktionsmittels in O_2 -freiem Medium zwischen $NaNO_2$ und Hb eine Verbindung entsteht mit denselben Absorptionsbanden wie Nitrosohämoglobin, ohne daß eine vor- ausgehende Methämoglobinbildung festgestellt werden konnte. Bei Gegen- wart eines Reduktionsmittels und bei pH -Werten von 5,15 - 6,63 wird durch 1 Mol $NaNO_2$ die äquivalente Menge Hämoglobin zu Nitrosohämoglo- bin umgebildet. Mit ansteigendem pH -Wert verlangsamt sich der Reaktions- ablauf und ist bei pH -Werten von 7,16 - 7,75 sehr gering. Ist weder Sauerstoff noch ein Reduktionsmittel vorhanden, so verbindet sich 1 Mol $NaNO_2$ mit 2 Äquivalenten reduziertem Hb und es entsteht 1 Äquivalent Nitrosohämoglobin und 1 Äquivalent Methämoglobin. Die Ergebnisse zeigen, daß NOHb eine Ferroverbindung wie O_2Hb und $COHb$ ist.

Nachdem erkannt worden war, daß sich Hämoglobin und Myoglobin in einigen Punkten unterscheiden, wurden auch eingehendere Untersuchungen über Reaktionen des Myoglobins mit Nitrit angestellt. So hat Watts (124) den Umrötungsvorgang in Fleischwaren folgendermaßen erklärt: Zunächst kommt es analog der Reaktion von Oxyhämoglobin mit $NaNO_2$ zur Metmyo- globinbildung, wobei Nitrat entsteht:



Daher wird auch Brühwurstbrät sofort nach Zugabe von Pökelsalz grau. Erst mit Beginn des darauffolgenden Erhitzungsprozesses, der bereits wäh- rend der Räucherung einsetzt, erfolgt durch zelluläre Fermente die Reduk- tion des Metmyoglobins. Nitrit wird zu Stickoxyd reduziert, das sich mit Myoglobin verbindet. Dieses Stickoxydmyoglobin oder Nitrosomyoglobin ist ein sehr unbeständiger Farbstoff, der jedoch durch Denaturation seines Eiweißanteils während des anschließenden Brühprozesses in Nitrosomyochro- mogen übergeführt wird und dadurch eine größere Beständigkeit gegenüber oxydativen Einflüssen erlangt. Der gleiche Effekt kann auch nach Denatu- rierung der Globinkomponente durch Kälte, Salze, Säure und gewisse Me- talle eintreten.

Die Bezeichnung "Nitrosomyochromogen" für denaturiertes Nitrosomyoglobin in gepökelten und erhitzten oder gereiften Fleischwaren ist nicht ganz exakt. Nach Terplan (114) müßte sie lauten: Denaturiertes Globin-Nitroso- Hämochromogen. (Hinsichtlich des Begriffes "Hämochromogene" wird auf Abschnitt I, 1 verwiesen). Nitrosomyochromogen stellt ein Additionsprodukt

des Häms mit denaturiertem Globin einerseits und Stickoxyd andererseits dar und ist sowohl in erhitzten als auch in rohen Fleischwaren zu finden; in letzteren wenn durch p_H -Senkung oder entsprechende Salzkonzentration eine Denaturierung des Proteinanteils erfolgt (114).

Nitrosomyochromogen ist zwar oxydativen Einflüssen gegenüber widerstandsfähiger als Nitrosomyoglobin, jedoch kommt es auch hier unter bestimmten Bedingungen leicht zu Oxydationen. So kann in Fleischereien häufig die Beobachtung gemacht werden, daß umgerötete Fleischwaren verblassen, wenn sie einige Zeit hellem Licht ausgesetzt waren. Kampschmidt (57) untersuchte den Einfluß des Lichtes bei Verfärbungen von Fleischwaren. Lichtstrahlen beschleunigten die Dissoziation des Nitrosomyochromogens in NO und Myochromogen, und letzteres war gegenüber oxydativen Einflüssen sehr anfällig. Er machte weiterhin die Beobachtung, daß reine Nitrosomyoglobininlösungen bei den Wellenlängen des Lichtes am stärksten dissoziierten, die von Nitrosomyoglobin weitgehend absorbiert wurden. Nach Ginger und Schweigert (27) liegt die maximale Absorption von Nitrosomyoglobin bei 544 $m\mu$ und 575 $m\mu$. Nitrosomyochromogen, das nach Hornsey (47) mit 80 %iger Aceton- H_2O -Lösung extrahiert wird, hat Absorptionsmaxima bei 476 $m\mu$, 535 $m\mu$ und 563 $m\mu$.

Die p_H -Abhängigkeit der Umrötung wurde von Duisberg und Miller (21) beschrieben. Unter p_H 5 ist die Farbbildung mangelhaft, auch wenn hinreichend $NaNO_2$ für die Umrötung zur Verfügung steht. Myoglobin soll in diesem p_H -Bereich denaturiert werden. Die optimalen p_H -Werte für die Umrötung liegen zwischen 5,2 und 6,0. Bei p_H 7 war zwar Farbbildung zu beobachten, jedoch erfolgte Beschleunigung des Reifeprozesses, sodaß die Fleischproben in einigen Fällen unerwünscht weich wurden.

Weiterhin wird die Farbbildung auch durch die Temperatur beeinflusst. Winkler und Hopkins (127) beobachteten bei Schinken zwischen 40 und 50 °C eine Zunahme der Farbintensität mit der Erhitzungsdauer; bei 80 °C kam der Umrötungsprozeß dann zum Stillstand. Kemp und Mitarbeiter (65) fanden, daß trocken gepökelte Schinken bei Räucher-temperaturen unter 43,3 °C eine ansprechendere Farbe bekommen als bei der Heißräucherung.

Auf die Bedeutung der Mikroflora bei der Salpeterreduktion wurde bereits hingewiesen. Die unmittelbare Wirkung auf Hämoproteide soll zunächst an Hand der medizinischen Literatur erörtert werden.

Kämmerer (55) prüfte die Beeinflussung des Blutfarbstoffs durch Bakterien und kam zu folgenden Ergebnissen: Strepto- und Pneumokokken verursachen Methämoglobinbildung innerhalb weniger Tage; die Bildung farbloser Höfe auf Blutagarplatten ist an die tryptische Wirkung der Bakterien gebunden; farblose Zonen entstehen teils durch Hämatinbildung, teils durch Freiwerden des Blutfarbstoffes aus den Blutkörperchen und Diffusion des Hämoglobins oder Hämatins in die Umgebung; ein Abbau des Blutfarbstoffes über das Hämatin hinaus findet nicht statt. In einer weiteren Arbeit (56) berichtet er über die Fähigkeit von bestimmten Keimen, aus Blut Porphyrine zu bilden: Er versetzte Blutbouillon von p_H 7,0 - 7,3 mit einer Stuhlaufschwemmung und konnte nach 2 - 6 Tagen ein Porphyrin feststellen. Die Porphyrinbildung soll durch Sporenbildner, hauptsächlich obligate Anaerobier, hervorgerufen werden, die dazu aber Hilfsbakterien brauchen. Nach Jakob (50) können viele Keime, insbesondere Darmbakterien, auch in Reinkulturen Blutfarbstoff zu Protoporphyrin abbauen. Viele Aerobier sind aber auch fähig, in porphyrin- und hämatinfreien flüssigen Nährmedien Koproporphyrin zu bilden. Das Auftreten der von einigen Autoren beschriebenen Porphyrinbildung bei aseptischer Autolyse hält Jakob für unbewiesen.

Neill (91) berichtet, daß Pneumokokken in der Lage sind, Hämoglobin zu Methämoglobin zu oxydieren und letzteres wieder zu Hämoglobin zu reduzieren. Auch sterile Extrakte aus diesen Keimen zeigen gleiche Fähigkeiten. Ferner konnte steriles tierisches Gewebe (Niere, Hoden und Leber von Kaninchen) aufgrund seines Sauerstoffverbrauches Methämoglobin zu Hämoglobin reduzieren. Anaerobier (92) desoxygenieren Oxyhämoglobin, bewirken schnelle Reduktion von Methämoglobin zu Hämoglobin und, allerdings nur zu einem geringen Grad, auch die Oxydation von Hämoglobin zu Methämoglobin. Steriles pflanzliches Gewebe verhält sich ähnlich.

Neben diesen medizinisch-bakteriologischen Arbeiten liegen auch einige fleischtechnologisch begründete vor.

Frisches Fleisch verändert seine Farbe durch die oberflächliche Besiedlung mit Keimen. Brown und Tappel (12) berichten, daß starker Keimbefall zu einem Verbrauch des Sauerstoffes führen kann, wodurch Myoglobin entsteht, das dann allerdings für eine Oxydation anfällig ist. Die Reduktion tritt als Wechsel der hellroten Farbe (oxygeniertes Myoglobin) in Purpur (Myoglobin) in Erscheinung. Robach und Costilow (104) beimpften die Oberflächen von "Steaks" mit verschiedenen Keimen:

Mehrere *Pseudomonas*-Arten, *Achromobacter liquefaciens*, *Flavobacterium rhenanus*, *Lactobacillus plantarum*, *Saccharomyces cerevisiae*. Mit Ausnahme von *L. plantarum*, der ein sehr geringes O_2 -Bedürfnis hat, sollen die genannten Keime die O_2 -Spannung der oberflächlichen Gewebsschichten verringern. Bei kleiner Keimzahl war schnelleres Auftreten einer Braunfärbung zu beobachten als bei massiver Beimpfung, die auffallend rasch zur Ausbildung einer purpurnen Farbe führte. Bei niedriger O_2 -Spannung (10 mm) erfolge allerdings Metmyoglobinbildung an der Oberfläche auch ohne Bakterieneinwirkung. Auch Urbain und Greenwood (119) fanden, daß Keime Oxymyoglobin zu Myoglobin reduzieren können, das dann leicht zu Metmyoglobin oxydiert wird.

Jensen und Urbain (54) stellten fest, daß auch Grünverfärbungen in frischem und gepökeltem Fleisch durch mikrobielle Einwirkung zustande kommen können. Es handelt sich dabei um Keime, die Myoglobin, Nitrosomyoglobin, Nitrosomyochromogen und Hämatin oxydieren. Eine Differenzierung der Keime wurde nicht vorgenommen. Schwefelwasserstoffbildende Bakterien verursachen ebenfalls Grünverfärbung. In einer neueren Arbeit weist Jensen (52) darauf hin, daß neben mikrobiell bedingten Vergrünungen durch Peroxydase, Oxydase oder Schwefelwasserstoff bildende Keime auch chemische Ursachen vorliegen können: Sowohl zu schwache als auch zu starke Nitritkonzentrationen (letzteres als "Nitritbrand" bekannt).

Niven (97) untersuchte die Ursachen bakteriell bedingter Grünverfärbungen in Würsten. In der Hauptsache waren *Lactobacillus*- und *Leuconostoc*-Arten in den verfärbten Bezirken zu finden, beides Peroxydbildner. Niven, Castellani und Allanson, (zit. nach Terplan (114)), differenzierten 30 aus verfärbten Fleischwaren isolierte Stämme in 20 heterofermentative *Lactobacillus*stämme und 10 Stämme der Gattung *Leuconostoc*.

Kotter (70) wies auf die Möglichkeit hin, daß Grünverfärbung bei Brühwürsten durch Verarbeitung bakterienreicher Mundschleimhaut entstehen kann. Zeller (131) ermittelte als Erreger einer Kern-Grünverfärbung bei Bierwurst und Fleischkäse zwei *Lactobazillen*stämme. Er vermutete, daß der grüne Farbstoff durch mikrobiell bewirkte Oxyd- oder Peroxydbildung entstanden ist.

4. Pökelhilfsstoffe und ihre Bedeutung für die Umrötung

Auf die reduzierende Wirkung von Zuckern, Ascorbinsäure und anderen Stoffen gegenüber Methämoglobin wurde bereits hingewiesen, ebenso auf die günstige Beeinflussung der Fleischfarbe durch Ascorbinsäure. Die positive Beeinflussung von Umrötung und Farbhaltung durch Zucker wird vom fleischverarbeitenden Gewerbe schon lange ausgenützt. Die Anwendung erfolgte meist empirisch. Erst in letzter Zeit wurde die Wirkungsweise dieser Stoffe beim Umrötungsvorgang näher untersucht.

Greenwood und Mitarbeiter (39) erklärten die Bedeutung der Zucker für die Farbe gepökelter Fleischwaren damit, daß reduzierende Bedingungen geschaffen werden und damit günstige Voraussetzungen für die Reaktion von Stickoxyd mit Myoglobin. Weiterhin soll die Oxydation von Ferro- zu Ferrihämoglobinderivaten während der Lagerung vermindert werden. Mit Dextrose wurden die besten Ergebnisse erzielt. Sie wird auch von den Keimen am schnellsten verwertet, was stärkeres Keimwachstum und damit eine Senkung des p_H -Wertes bewirkt als in Vergleichsproben ohne Zuckerzusatz oder mit Rohrzucker. Hohe Konzentrationen von Dextrose verursachen jedoch unerwünschte Farbveränderungen, da infolge starker Erniedrigung des p_H -Wertes Oxydation des Myoglobins erfolgt. Die beim mikrobiellen Abbau der Zucker gebildete Milchsäure soll der Hauptlieferant für Wasserstoffionen sein. Ingram (49) sieht in dem durch Zucker vermehrten Bakterienwachstum auch insofern einen positiven Einfluß, als nicht nur ein für die Farbbildung günstiges p_H , sondern auch eine erwünschte Senkung des Redoxpotentials herbeigeführt werde.

Während die mikrobielle Beeinflussung durch Zucker als weitgehend gesichert gelten kann, sind die chemischen Vorgänge bei Zuckerverwendung noch ziemlich unerforscht. Trotz mangelnder wissenschaftlicher Erkenntnisse kann gesagt werden, daß "weise" Verwendung geringer Zuckermengen den Pökelprozeß günstig beeinflußt. Vorteile wie Geschmacksverbesserung, zartere Beschaffenheit, schnelle und bessere Umrötung und Farbhaltung, gleichmäßigere und raschere Durchsalzung können nicht unmittelbar den Zuckern zugeschrieben werden. Vielmehr hat es den Anschein, als ob Zucker indirekt das p_H -Optimum für eine einwandfreie Pökelung schaffen helfe (Grau (34)).

Die günstige Beeinflussung der Umrötungsvorgänge durch Ascorbinsäure ist noch nicht anzulange bekannt. Durch Ascorbinsäure wird aus Nitrit NO frei-

gesetzt, das dann für die Umrötung zur Verfügung steht. Gleichzeitig wird der umgerötete Muskelfarbstoff stabilisiert.

Bei entsprechendem Ascorbinsäurezusatz (0,03 %) genügt nach Grau und Böhm (37) bereits eine 0,3 %ige Nitritkonzentration im Nitritpökelsalz, um in Brühwürsten Umrötung und gute Farbhaltung zu erhalten. Auch Souci (108) kam zu ähnlichen Ergebnissen.

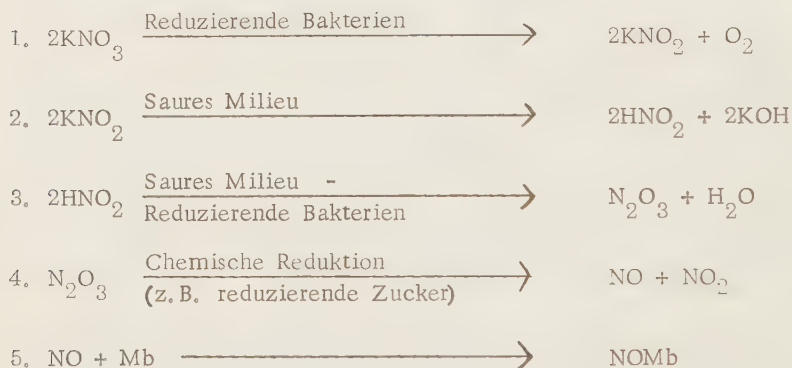
Die im Fleisch vorhandenen Sulfhydrylgruppen gehören zwar nicht zu den Pökelfarbstoffen, sollen aber infolge ihres ähnlichen Verhaltens ebenfalls hier diskutiert werden. Nach Watts und Mitarbeitern (12) erfolgen Reduktion von NO_2 und Metmyoglobin, wodurch die Bildung von Nitrosomyoglobin ermöglicht wird, eher durch Sulfhydrylgruppen als durch reduzierende Fermentsysteme. Die SH-Gruppen werden während des Erhitzungsprozesses aus den Muskelproteinen freigesetzt. Ist genügend Nitrit vorhanden, so wirken Sulfhydrylgruppen farbstabilisierend, fehlen diese so wirkt Nitrit oxydierend.

Hornsey (47) extrahierte "Nitrosopigmente" aus gekochtem und rohem gepökeltem Schweinefleisch. Die Stabilität der Azetonextrakte, die Nitrosomyoglobin enthielten, war gering, sie verblaßten bei Tageslicht rasch, während Extrakte mit Nitrosomyochromogen langsamer verblaßten. Azetonextrakte aus reinen Nitrosohämoglobinlösungen verloren ihre Farbe fast augenblicklich. Dies wird darauf zurückgeführt, daß beim Extrahieren unterschiedliche Mengen an reduzierenden Stoffen mit in Lösung gehen. Freie SH-Gruppen, wie Cystein und Glutathion, die in erhitztem Fleisch in reduziertem, in rohem Fleisch in oxydiertem, teils in reduziertem Zustand vorliegen, sollen die wirksamen Substanzen sein. In einer weiteren Veröffentlichung teilt Hornsey (48) mit, daß der Cystein Gehalt der Fleischwaren ein Maßstab für deren reduzierende Eigenschaften und damit auch für Farbbildung und Farbstabilität ist. Auch Brown und Tappel (94) erwähnen das Reduktionsvermögen der Sulfhydrylgruppen in Fleischwaren, die allerdings durch hohe Temperaturen zerstört werden sollen. Neben Ascorbinsäure entfalten die SH-haltigen Verbindungen die stärkste reduzierende Wirkung in gepökeltem Fleisch. Letztere kommen allerdings wegen ihres hohen Preises für eine Verwendung in der Fleischwirtschaft nicht in Betracht.

5. Umrötung während der Rohwurstreifung

Für die Umrötung von Rohwürsten sind Bakterien entweder eine *conditio sine qua non* - sofern Nitrat verwendet wird - oder zumindest fördernd Faktor sofern mit Nitritpökelsalz allein gearbeitet wird.

Niinivaara (93) gibt für den Umrötungsprozeß in Rohwürsten folgendes Schema an:



Voraussetzung für die Bildung von Nitrosomyoglobin ist, daß: Nitrat gegenwärtig ist; genügend nitratreduzierende Bakterien vorhanden sind; der p_{H} -Wert der Wurst in den ersten 1 - 2 Tagen oberhalb p_{H} 5,6 liegt, sodaß die bakterielle Reduktion des Nitrates stattfinden kann; der p_{H} -Wert der Wurst danach unter p_{H} 5,4 sinkt, um die chemische Reduktion des Nitrits zu ermöglichen.

In Rohwürsten ist nur in den ersten 3 Tagen nach der Herstellung wasserlösliches Nitrosomyoglobin zu finden. Später kann der Farbstoff nur noch mit organischen Lösungsmitteln extrahiert werden. Die maximale Lichtabsorption des wässrigen Extraktes liegt bei 535 und 575 $m\mu$, die von Äther-Äthylalkohol- und Äthylazetatextrakten bei 505, 535 und 635 $m\mu$. Niinivaara hat den wasserlöslichen Farbstoff als Nitrosomyochromogen angesprochen. Die Farbe der Rohwurst ist also im wesentliche eine Stickoxydverbindung des denaturierten Myoglobins unter Beteiligung weiterer Formen des Muskelfarbstoffes (93). Die wesentlichen Voraussetzungen für die Farbbildung sind die bereits besprochene Nitratreduktion und die Zuckerfermentation. Die Begünstigung der Umrötung durch Mikrokokken wurde

zum Teil empirisch und zum Teil durch chemische Untersuchungen festgestellt (77, 78).

Niinivaara (93) empfiehlt den Mikrokokkenstamm M 53 als "Starter-Kultur" für die Rohwurstherstellung. Er zeichnet sich durch kräftiges Nitratreduktionsvermögen aus und sichert daher schon im Anfangsstadium der Herstellung bei genügend hohem p_H -Wert der Wurst ($> 5,4$) ausreichende Nitritproduktion. Außerdem fördert M 53 aber auch die Milchsäurebildung, so daß ein für die Nitrosomyoglobinbildung günstiger p_H -Wert geschaffen wird, auf zweifache Art. Einmal schafft er als aerober Bakterienstamm im Anfangsstadium der Reifung in der Wurst anaerobe Verhältnisse, zum anderen bildet er Säure aus zugesetzten Zuckern. Dadurch wird schon im Laufe von 48 Stunden ein p_H -Wert von 5,4 erzielt, während der gleiche Vorgang bei nicht beimpften Kontrollen 5 Tage in Anspruch nahm. Die Umrötung erfolgt mit M 53 doppelt so rasch als in Kontrollen.

Die Umrötung scheint aber auch unabhängig von der Nitratreduktion durch Keime induziert zu werden. So bewirken nach Lerche (78) Hefen in Rohwürsten ein leuchtendes Rot. Die in Rohwürsten regelmäßig vorkommenden *Debaromyces*-Arten sind zwar nicht in der Lage, Nitrat zu reduzieren, sie haben aber ein starkes Sauerstoffbedürfnis und sollen hierdurch stark rötend wirken. Das leuchtende Rot der luftgetrockneten, hefereichen italienischen Salami beruhe in erster Linie auf der Hefewirkung. Zunächst wurde auch an Ascorbinsäurebildung durch Hefen gedacht. Diese Vermutung hat sich jedoch nicht bestätigt. Nach Giske (31) sollen nitrathaltige Würste bessere Farbbildung aufweisen als nur nitrit-haltige.

Zucker und Ascorbinsäure werden auf dem Rohwurstsektor mit Erfolg verwendet. Zucker haben, wie Niinivaara (93) auch für die Rohwurstreifung herausstellt, auf die Umrötung keinen direkten Einfluß, aber sie werden von Mikroorganismen abgebaut, und es entstehen Säuren, wodurch der p_H -Wert herabgesetzt wird. Zucker fördern bei Anwesenheit von Mikroorganismen die Umwandlung von Oxymyoglobin zu Myoglobin; sie fördern die Reduktionsgeschwindigkeit des Nitrits zu Stickstoffoxyd und dadurch die Bildungsgeschwindigkeit von Nitrosomyoglobin; sie verhindern die Oxydation von Myoglobin zu Metmyoglobin. Glukose, Fruktose, Mannose und Galaktose wirken im großen und ganzen gleich schnell, Saccharose, Maltose, Laktose und Xylose wiederum etwas langsamer.

Die Reaktion ist auch von der Konzentration des betreffenden Zuckers abhängig

Insbesondere der Wirkung von Ascorbinsäure konnte Souci (19*) feststellen, daß nur bei Verwendung von Nitrit Verbesserung der Umroting erfolgt (Erhöhung des Nitrosopigments im Verhältnis zur Gesamtmenge des Muskelpigments). Bei den mit Salpeter angefertigten Rohwürsten war keine begünstigende Wirkung zu erkennen. Kelch und Heidtmann (61) meinen, daß durch Zusatz von Recorbin, einem Ascorbinsäurepräparat, die Farbhaltung schnittfester Rohwurst eindeutig verbessert wird.

Den basischen Aminosäuren wird gleichfalls farbverbessernde Wirkung eingeräumt (83).

Die Senkung des p_H -Wertes beeinflußt nicht nur über die biochemischen Reaktionen den Ablauf der Farbbildung, sondern auch über eine Zustandsänderung der Eiweißstoffe (93). Wenn das p_H des Fleisches in den Bereich der isoelektrischen Punktes der Fleischproteine herabsinkt, so gelangen diese infolge Gelverfestigung eine dichtere Struktur, in welche die Lichtstrahlen dann nicht so tief eindringen können, als wenn die Proteine hydratisiert sind und bei dichterem Struktur werden die einfallenden Lichtstrahlen von den oberen Schichten der Muskelfasern reflektiert; das Fleisch erscheint hellrot. Bei höherem p_H und dementsprechend stärker hydratisierten Proteinen wird das Licht von tieferen Schichten reflektiert; das Fleisch erscheint dunkelrot.

Pezzone (99) empfiehlt für die Rohwurstherstellung ein Anfrieren des dazu verwendeten Rindfleisches bei -3°C . Diese Würste sollen in fertigem Zustand eine bessere Farbenhelligkeit aufweisen als jene, deren Rindfleisch nur gekühlt oder bei -8°C angefroren wurde.

Mangelhafte Umroting und Verfärbung können viele Ursachen haben. Geringes Pökelfstoffangebot infolge zu geringen Zusatzes oder durch mangelhaften Nitratabbau infolge zu rascher Säuerung. Letztere kann durch starke Kontamination mit Lactobazillen oder durch zu hohen Zuckerzusatz bei gleichzeitig hohen Reifungstemperaturen erfolgen. Bei Anwesenheit von peroxydbildenden Lactobacillen kommt es zur Oxydation des Myoglobins oder sogar des Porphyrinringes, wobei grüne Farbstoffe (Verdoglobine,

Choleglobine) entstehen. Gelegentlich soll auch durch mikrobiell freigesetzten Schwefelwasserstoff Sulfmyoglobin gebildet werden (16, 17, 19). Durch aerobe Sporenbildner wird Porphyrin freigesetzt, das Schönberg (104 a) unter Verwendung von filtriertem UV-Licht nachwies. Nach Deibel und Evans (19) entstehen Grün- oder Grauverfärbungen, wenn zuviel Nitrit vorhanden ist. Dies kann einmal direkt durch Zusatz einer hohen Nitritmenge oder aber durch bakterielle Reduktion von Nitrat erfolgen. Die Ursachen für die Rotverfärbung des Specks konnten bisher noch nicht gefunden werden.

II. Einwirkung von Keimen auf Rohwurstproteine

1. Allgemeines zur proteolytischen Wirksamkeit von Keimen und deren Verhalten gegenüber Aminosäuren

Endopeptidasen sind ebenso wie Exopeptidasen unentbehrliche Fermente einzelliger Lebewesen (48). (Exopeptidasen können nur Peptidbindungen am Ende einer Peptidkette hydrolysieren; Endopeptidasen sind in der Lage, solche Bindungen auch im Innern der Polypeptidkette zu spalten.) Meist handelt es sich nur um intrazelluläre Enzyme, die erst nach dem Absterben der Zellen freigesetzt werden. Einige Keimarten, besonders Clostridien, sind jedoch auch in der Lage, hochaktive Peptidasen abzuscheiden. Virtanen und Tarnanen (121) berichten über die Sekretion einer Proteinase durch *Pseudomonas fluorescens* und *Bac. subtilis*. Güntelberg und Ottesen (zit. nach Hoffmann-Ostenhof (48)) konnten das Enzym von *Bac. subtilis* kristallin darstellen und fanden, daß es relativ unspezifisch ist und daher mehr Peptidbindungen spalten kann als die kristallinen Enzyme tierischer Herkunft.

Janke und Holzen (51) fanden, daß dieselben proteolytischen Enzyme bei den verschiedenen Bakterienarten einmal als Endo- und einmal als Exoenzyme auftreten können. Werden Endoenzyme gebildet, so werden dieselben erst nach Schädigung der Zellgrenzschichten auch in der Umgebung wirksam.

"Acidoproteolytische" Enterokokken entwickeln nach Gorini, Grassmann und Schleich (33) Proteinasen, die zwischen dem Papain- und Trypsintyp einzuordnen sind und sezerniert werden, während die festgestellten Peptidasen an die Bakterienzelle gebunden sind. Nach

Maschmann (84) gehören die Bakterienproteinasen von *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Serratia marcescens* nicht zu den Papainasen und sehr wahrscheinlich auch nicht zu den Tryptasen; ihr Optimum gegenüber Gelatine und Kasein liegt bei p_H 7,2. *Streptococcus lactis* entwickelt nach van der Zant und Nelson (120) ein endozelluläres proteolytisches Ferment mit einem p_H -Optimum von 6,0 - 7,5. Durch die Aktivität dieses Fermentes werden Tyrosin und Tryptophan freigesetzt.

Grassmann und Dyckerhoff (zit. nach Hoffmann-Ostenhof (46)) konnten aus Hefe-Autolysaten eine Endopeptidase isolieren, die sich weitgehend wie Papain verhält.

Wesentlich für biochemische Vorgänge in Fleischwaren ist die Einwirkung mikrobieller Fermente auf Aminosäuren. So verfügt *Lactobacillus casei* über ein Desaminasesystem und spaltet von Serin, Cystin und Asparagin Ammoniak ab. Aerobe Bedingungen oder ein Zusatz von 2 % Glukose setzen die Desaminaseaktivität herunter (72). Auch die bakterielle Decarboxylierung von Aminosäuren ist bekannt. *Escherichia coli* ist in der Lage Arginin zu Agmatin, Lysin zu Kadaverin, Histidin zu Histamin und Glutaminsäure zu β -Aminobuttersäure zu decarboxylieren (26). Von 33 nicht näher differenzierten *Lactobacillus*-Stämmen bauten 12 Arginin, 3 Glutaminsäure, 3 Tyrosin, 1 Histidin und 1 Ornithin unter CO_2 -Bildung ab. *Lactobacillus casei* und *Lactobacillus arabinosus* sowie *Streptococcus mitis* und *Streptococcus faecalis* produzierten aus den genannten Verbindungen kein Kohlendioxyd (73).

2. Einfluß proteolytischer Keime bei der Rohwurstherstellung

Pohja (101 a) sah, daß von 171 "Fleischmikrokokken" 57 % Gelatine verflüssigten und 15 % Kasein hydrolysierten. Pohja und Niinivaara (102) prüften das Verhalten von 14 aus Rohwürsten isolierten *Bacillus*-Stämmen gegenüber Gelatine-, Kasein- und Fleischnährböden. Alle *Bacillus*-Stämme verflüssigten Gelatine und hydrolysierten Kasein wie Fleisch. Von 137 Mikrokokkenstämmen verflüssigten 105 Gelatine und von diesen wiederum wiesen 16 auch gegenüber Fleisch proteolytische Eigenschaften auf. Lang (75) untersuchte Abklatschpräparate von einer faulig zersetzten Rohwurst (Kernfäulnis) und bemerkte plumpe grampositive Stäbchen und Diplokokken, die aufgrund ihres biochemischen Verhaltens den Lacto-

bacillen beizuordnen sind. Gelatineverflüssigung konnte nicht beobachtet werden, jedoch wurde bei wiederholt durchgeführten Prüfungen stets Ammoniakbildung festgestellt, weshalb Eiweißabbau, ohne die Desaminierung zu würdigen, vermutet wurde. Nach Niinivaara und Mitarbeiter (96) nimmt die Menge der Proteolyten kurz nach Herstellung der Rohwürste zu (Gattung *Bacillus*). Obwohl diese Keime fähig sind, auch schwerangreifbare Eiweißstoffe des Fleisches abzubauen, haben sie für die Rohwurstreifung keine größere Bedeutung, da ihre weitere Vermehrung durch den bald nach der Herstellung einsetzenden Abfall der p_H -Werte und Anstieg der Salzkonzentration nicht mehr möglich ist (p_H -Abfall bis 4,7 und Ansteigen der Salzkonzentration auf über 4 %).

Über die Bedeutung der Mikroflora hinsichtlich der Zunahme der wasserlöslichen Stickstoff-Fraktion während der Rohwurstreifung gehen die Meinungen auseinander. Nach Giolitti (30) sind die Keime in Rohwürsten vom Typ "Milano" für den Gehalt an freien Aminosäuren ohne Bedeutung. Auch Maillet und Henry (83) halten die mikrobielle Proteolyse für unbedeutend.

Bianchi (6) stellt in Salamiwürsten vom Typ "Felino" ein Anwachsen des Betrages an freien Aminosäuren fest, und begründet es mit mikrobiellen-enzymatischen Vorgängen. Pezacki und Duda (100) beobachteten während der Reifung und Lagerung von Cervelatwürsten proteolytische Vorgänge. Kurz nach Herstellung der Würste waren sie besonders intensiv, ebten aber im Verlauf der Lagerung ab. Dagegen konnte man mit zunehmender Lagerzeit eine fortschreitende Umwandlung der Aminosäuren wahrnehmen. Da die größte Intensität der proteolytischen Vorgänge bei Erwärmung der Würste und Vermehrung der Mikroflora während des Räucherns stattfindet, führen sie die Proteolyse unter anderem auf den Einfluß von bakteriellen aber auch von Gewebs-Fermenten zurück.

Vielfach findet man in neueren Arbeiten über Veränderungen der wasserlöslichen Stickstoff-Fraktion in Rohwürsten Hinweise auf fermentative Vorgänge während der Fleischreifung. Deshalb sollen an dieser Stelle einige einschlägige Arbeiten erwähnt werden.

Die in verschiedenen tierischen Geweben enthaltenen proteolytischen Fermente werden nach Willstätter und Bamann (zit. nach Hoffmann-Ostenhof (46)) Kathepsine genannt. Am stärksten ist das Autolysevermö-

gen des Nierengewebes (13), etwas geringer das der Leber; Skelettmuskulatur autolytisch relativ schwach. Nach Snoke und Neurath (107) entfaltet ein aus Kaninchenmuskulatur extrahiertes proteolytisches Ferment bei p_H 4,0 optimale Wirksamkeit, während es bei p_H 6,0 größte Stabilität erlangt. In einer neueren Arbeit (74) wird für Muskelkathepsine eine optimale Wirksamkeit bei p_H 9 angegeben; die Wirksamkeit bei p_H 4-5 ist geringer. Zender und Mitarbeiter (zit. nach Grau (36)) meinen, daß für die Muskelkathepsine bei den entsprechenden p_H -Werten zwar optimale Verhältnisse gegeben sind, daß aber zunächst keine Proteolyse unter Bildung von Polypeptiden und Aminosäuren erfolgt, weil entweder die Konzentration der Kathepsine im Muskel zu gering sei oder das Substrat die Enzymtätigkeit hemme. Nach Locker (80) liegen im intakten Muskel proteolytische Fermente in gebundener Form vor. So sind die Kathepsine der Leberzellen zusammen mit anderen hydrolytischen Fermenten an die "Lysosome" gebunden. Solange diese Granula unbeschädigt sind, kann keine Proteolyse wahrgenommen werden. Erfolgt eine Beschädigung, z.B. durch Homogenisierung oder durch eine Bebrütung bei $37^{\circ}C$, so entwickeln die Enzyme eine beachtliche Wirksamkeit.

Henry und Maillet (83) führen das Ansteigen des wasserlöslichen Stickstoffs auf Proteolyse durch Muskelenzyme zurück. Im Rind- und Schweinefleisch, das 4 - 6 Tage bei 3 bis $4^{\circ}C$ reifen kann, steigt der wasserlösliche Stickstoff auf 18 %, im Schweinefleisch auf 22 % der Gesamtstickstoffmenge an. Auch Ginger und Mitarbeiter (29) beobachteten bei Fleisch nach 2 Wochen langer Lagerung eine Zunahme des Aminostickstoffes.

Nach Grau (36) soll der Gehalt an freien Aminosäuren im reifenden Fleisch nur unwesentlich ansteigen, ebenso wie der lösliche Stickstoff nur unwesentlich vermehrt werden soll. Schormüller und Adler (105) stellten für Fleisch, das 14 Tage bei $+4^{\circ}C$ reifen konnte, eine Stickstoffbilanz auf und konnten keine Anhaltspunkte für einen wesentlichen proteolytischen Abbau finden. Nach ihren Angaben steigt der Reststickstoff während der Reifung nicht an. Er betrug nach 14tägiger Reifung für die Rückenmuskulatur 12,68 % und für die Vorderbeinmuskulatur 10,16 % des Gesamtstickstoffes. Die Verfasser untersuchten weiterhin Menge und Zusammensetzung der freien Aminosäuren während der Reifung und fanden, daß bereits zu Beginn der Reifung alle auch später gefundenen Aminosäuren auftreten und das Aminosäurespektrum lediglich hinsichtlich der Menge

der einzelnen Aminosäuren eine Änderung erfährt. Die Menge an neutralen und sauren Aminosäuren steigt innerhalb von 14 Tagen von 73,7 mg auf 176,6 mg an; die gebundenen Aminosäuren nehmen von 140 mg auf 287,1 mg zu. (Der Gesamtbetrag der gebundenen Aminosäuren ergibt sich aus der Differenz der Aminosäuren in hydrolysierten und nicht hydrolysierten Extrakten.) Von den neutralen und sauren Aminosäuren weisen Glykokoll, Alanin, Glutaminsäure und Serin schon zu Beginn die stärkste Konzentration auf, Phenylalanin und Leucin steigen im Verlauf der Reifung am stärksten an, während die von vornherein reichlich vertretenen Aminosäuren nur schwache Steigerung erfahren. Der Anteil des Aminosäuren-N am Rest-N für saure und neutrale Aminosäuren beträgt zu Beginn der Reifung 2,8 % und nach 14 Tagen 5,4 %.

Nach Locker (80) sind proteolytische Vorgänge für die Fleischreifung ohne Bedeutung. Howard und Lawrie (zit. nach Grau (36)) konnten bei der Lagerung von Rindfleisch keine bemerkenswerte Proteolyse feststellen; ein gewisser Abbau von Peptiden und Nucleotiden gehe aber unter p_H -Erhöhung doch vor sich. Gorbатов (zit. nach Maillet und Henry (83)) meint, daß Aroma und Geschmack von frischem Fleisch nicht auf proteolytische oder lipolytische Vorgänge zurückzuführen sei, sondern auf Abbau von Nucleotiden und Freisetzung von Purinbasen, insbesondere Hypoxanthin.

Auch bei Rohwürsten wurden Änderungen im Proteingehalt geprüft. Maillet und Henry (83) untersuchten 1 - 2 Monate gelagerte Rohwürste (10 Stück verschiedenen Typs) und stellten durchschnittlich 21,3 % ($\pm 2,2$) wasserlöslichen Stickstoff, bezogen auf den Gesamtstickstoff, fest, eine Menge, die etwa der in gelagertem Rind- und Schweinefleisch entspricht. An freien Aminosäuren war eine Zunahme zu verzeichnen. Carnosin schien während der Reifung und Lagerung keine Änderung zu erfahren. Die sauren Aminosäuren, die in frischem Fleisch nur in Spuren vorkommen, nahmen in den am längsten gelagerten Würsten zu, besonders die Glutaminsäure, in geringerem Umfang auch die Asparaginsäure. Böhm und Grau (38) werten das Auftreten von Asparaginsäure als Zeichen fortgeschrittener Autolyse. Die Mengen an neutralen Aminosäuren schwanken zwischen 30 und 167 mg/100 g Wurstmasse, was gegenüber einem Wert von 5 - 10 mg in 100 g frischem Rindfleisch und 10 - 15 mg in 100 g frischem Schweinefleisch eine beachtliche Zunahme bedeutet. Basische Aminosäuren weisen in frischem Fleisch einen Gehalt von etwa 2 mg/100 g

auf, in gut gereiften Würsten schwankte die Menge zwischen 50 mg und 160 mg/100 g Wurstmasse. Würste von schlechtem Geruch und Aroma hatten weniger als 10 mg/100 g an basischen Aminosäuren.

Pezacki und Duda (100) fanden, daß Veränderungen an den Proteinen im Rohwurstkern am intensivsten waren. Der stärkste Abbau war an Myosin, Myogen, Myoalbumin und Nucleoproteiden festzustellen. Während der ersten 10 Tage der Aufbewahrung soll eine ausgiebige Auflösung der Zellkerne stattfinden. Aus den Abbauvorgängen ergibt sich das Anwachsen des Betrages an nicht-proteinhaltigen Stickstoffbestandteilen auf 255 % innerhalb von 14 Tagen. Glutaminsäure, Lysin, Glycin, Alanin, Arginin nehmen in der Reihenfolge am stärksten zu und erreichen das jeweilige Maximum nach abgeschlossener Reifung oder nach kurzer Lagerung. Niinivaara und Mitarbeiter (96) verwendeten als Untersuchungsobjekt 2 verschieden gereifte Rohwurstserien. Bei Serie A (Reifung in Autotherm-Klimaanlage) betrug der Anfangswert an wasserlöslichem Stickstoff 16,5 % und sank nach 4 Wochen auf 12,3 %. In Serie Ö (Reifung in Örico-Rauchanlage) betrug der Ausgangswert 15,1 %, stieg nach 2 Wochen auf 19,6 % an und ging nach 3 Wochen auf 17,5 % zurück. Amino- und Ammoniakstickstoff nahmen nur sehr langsam zu. Proteolyse und Desaminierung der Eiweißstoffe fanden nur in geringem Maße statt. Die vorgefundenen Aminosäuren waren dieselben wie im Fleisch. Körömendi und Gantner (68) berichten, daß in ungarischen Rohwürsten (bei niederen Temperaturen gereift) der Aminostickstoff bis zum 40. Tag zunimmt; Carnosin + Anserin zeigten während der Reifung praktisch keine Veränderung; Glutaminsäure nahm erst ab, dann zu. Mit Abnahme der Glutaminsäure erschien die γ -Aminobuttersäure. Asparaginsäure nahm ebenfalls zu, ohne auch bis zum Ende der Lagerung (100 Tage) Abnahme erkennen zu lassen. In der Zone basischer Aminosäuren nahm die Intensität des Fleckes Arginin + Histidin + Lysin bis zum 40. Tag erheblich zu. Während der Aminostickstoff nach dem 40. Tage im Abnehmen begriffen war, stieg der Ammoniakstickstoff bis gegen das Ende der Lagerzeit stetig an. Als Gründe hierfür werden Desaminierung, Dekarboxylierung und Transaminierung von Aminosäuren angegeben. Die Abnahme von Cystin, Cystein und Histidin kann auch damit erklärt werden, daß während der Pökellung des Fleisches diese Aminosäuren mit Nitrit chemisch reagieren (100). Zunahme der Amine durch Dekarboxylasewirkung und Wirkung der Desaminasen können für das stetige Ansteigen des p_H -Wertes verantwortlich gemacht werden. Eine oxydative Desaminierung von Aminosäuren vermuten auch Pezacki und

Duda (100), da die freien Aminosäuren in der Randzone der Wurst bedeutend schneller abnehmen.

Maillet und Henry (83) prüften die Bildung von Histamin in Rohwürsten. Nur in Ausnahmefällen könnten Rohwürste für das Entstehen allergischer Erkrankungen verantwortlich gemacht werden, da bei normaler Reifung der Betrag an Histamin weniger als 2 mg/g Wurstmasse betrage. Nur in Würsten, die aufgrund ihrer übermäßig langen Lagerung für einen Verkauf nicht mehr in Frage kommen, oder in Würsten, die starke Besiedelung mit proteolytischen Keimen aufweisen, kann der Gehalt an Histamin 100 mg/g Wurstmasse überschreiten. Solche Würste werden jedoch im allgemeinen vom Verbraucher zurückgewiesen, da sie unerwünschte organoleptische Eigenschaften aufweisen.

III. Abbau von Fetten durch mikrobielle Fermente

1. Allgemeines zur lipolytischen Aktivität von Keimen

Die Literatur über den mikrobiologischen Abbau von Fetten, der sich insbesondere auf dem von Turner (118) empfohlenen Nilblausulfatnährboden leicht nachweisen läßt, ist umfangreich. Jensen (52) hat diese Literatur zusammengefaßt, soweit sie allgemein und speziell für den Fleischsektor von Interesse ist.

Bei der Einwirkung von Mikroorganismen auf Fette muß zwischen der Lipase-wirkung und der Wirkung auf die Fettsäuren, eventuell auch auf das Glycerin unterschieden werden. Bei seinen Studien über die Zersetzung der Fette durch Bakterien kam Haag (42) zu dem Ergebnis, daß Fettsäuren mit Doppelbindungen am leichtesten abgebaut werden; Palmitin- und Stearinsäure wurden in seinen Untersuchungen nur von einem Stamm (*Ps. aeruginosa*) angegriffen. Dieser Stamm konnte aber Triglyceride nicht spalten und zeigte, daß ohne vorherige Spaltung des Triglycerids weder Glycerin noch Fettsäuren des Triglycerids angegriffen werden. Auch sollen die Mikroorganismen in Fetten und Ölen mit größter Wahrscheinlichkeit keinen direkten Anteil an der Bildung der Ranzigkeit haben. Er bezeichnet das Ölsäuremolekül als den hauptsächlichsten Angriffspunkt sowohl für Mikroorganismen wie auch für den Luftsauerstoff, wobei der mikrobielle Abbau der Ölsäure glatt, ohne Bildung von Zwischenproduk-

ten erfolgen soll, während es bei der rein chemischen Oxydation der Ölsäure zur Bildung von Oxysäuren, Aldehyden und niederen Fettsäuren kommen kann. Nach Collins und Hammer (14) wird die bakterielle Hydrolyse von Triglyceriden mit Zunahme des Molekulargewichtes schwieriger.

Jensen und Grettie (53) haben bei ihren Studien über die hydrolysierende Wirkung der Bakterien festgestellt, daß bestimmte Bakterien Lipasen und Oxydasen bilden. Darauf führen sie die rasche Entwicklung von freien Fettsäuren und Oxydationsprodukten zurück. Sie beobachteten bei gelager-tem Schinken Fett (Lagerungstemperatur - 17,8 °C) eine Beziehung zwischen Stärke der Oberflächenbesiedelung und Tendenz zum Ranzigwerden, wobei dem Feuchtigkeitsgehalt des Fettes eine besondere Bedeutung zukam: Auf Fetten, die wasserfrei waren, konnten Keime nicht wachsen, während ein Wassergehalt von 3 % oder mehr das Wachstum bedeutend förderte. Castell und Garrard (13) sind der Ansicht, daß alle gramnegativen Bakterien, insbesondere *Pseudomonas* und *Achromobacter*, stark oxydierend wirken. Letztere gehören zu den sogenannten psychophilen Keimen und kommen bei Fetten und Fleischwaren häufig vor; sie sind in der Lage, sowohl bei Kühlagerung als auch Gefriertemperaturen zu wachsen. *Aerobacter*-, *Escherichia*- und *Proteus*-Arten wirken schwach oder überhaupt nicht oxydierend, ebenso die Gattung *Bacillus*, während Kokken und rein anaerobe Keime absolut oxydase-negativ sind.

Mukherjee (89) untersuchte den Einfluß der Mikroben auf das Ranzigwerden der Fette. Offensichtlich ist für den Ablauf der entsprechenden Reaktionen der Luftsauerstoff notwendig, zumindest unterstützt er ihn. Der erste Schritt scheint die Hydrolyse der Glyceride in freie Fettsäuren und Glycerin zu sein, worauf unmittelbar eine Oxydation der aufgespaltenen Komponenten erfolgt, und zwar Oxydation niedriger gesättigter Fettsäuren Oxydation ungesättigter Fettsäuren durch Lipoxydasen, Entsättigung gesättigter Fettsäuren durch Dehydrogenasen und ihre Oxydation. Daran schließt sich die Aufspaltung der entstandenen Peroxyde durch Peroxydasen.

Cutchins und Mitarbeiter (18) prüften die lipolytische Aktivität von *Ps. fluorescens* und beobachteten stärkere Lipaseproduktion, sobald den Nährmedien Vitamin B oder Asparaginsäure zugesetzt wurde. Goldman und Rayman (32) haben festgestellt, daß die lipolytische Aktivität von Keimen, die gleichzeitig Proteolyten sind, bei niedrigem Eiweißangebot stärker, bei höherem Eiweißangebot schwächer ist. Dies trifft insbesondere

für Pseudomonaden zu, von denen *Ps. fluorescens*, *Ps. oleovorans* und teilweise auch *Ps. fragi* starke Lipolyten sind und bis zu 90 % der den Nährmedien zugesetzten Fette hydrolysieren können.

Nashif und Nelson (90) berichten über das Auftreten von extrazellulären Lipasen bei gramnegativen Keimen (*Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*).

2. Lipolytische Tätigkeit von Keimen in Rohwürsten unter Berücksichtigung der Aromabildung

Lerche und Lammers (79) prüften aus Rohwürsten isolierte Hefen auf Fettspaltung. Von 6 Hefearten - *Torulopsis candida*, *Candida lipolytica* und *Candida parapsilosis*, *Hansenula anomala*, *Candida zeylanoides* - erwies sich *Candida lipolytica* als Fettspalter. Zum Nachweis der Fettspaltung wurde Rinderfett mit Gorodkowa-Agar, dem 0,1 % Calciumcarbonat zugesetzt worden war, überschichtet.

Niinivaara und Pohja (94) fanden kleine gramnegative Stäbchen in verhältnismäßig großer Menge während der Vortrocknung von Rohwurst. In einer weiteren Veröffentlichung (95) berichteten sie über die Zusammensetzung der Mikroflora während verschiedener Herstellungsphasen. Unter 27 identifizierten Bakterienarten waren zwei Arten der Gattung *Alcaligenes* und je eine Art von *Achromobacter*, *Aerobacter* und *Flavobacterium* ermittelt worden. Diese gramnegativen Keime waren auf Schweinefettagar teilweise starke Aromabildner. Kohnle (69) untersuchte Rohwürste auf aromabildende Keime. Während er durch Bebrütung der Nährböden bei 37 und 20 °C fast nur Mikrokokken und aerobe Sporenbildner isolieren konnte, wuchsen bei 12 °C "in die Gruppe der Enterobacteriaceae" gehörende Keime, und zwar die Gattungen *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Aerobacter*, *Achromobacter* und *Escherichia*, von denen insbesondere die beiden letztgenannten kräftige Aromabildung zeigten. Die Aromabildung erfolge durch Spaltung von Fett und Traubenzucker und sei kulturell durch Züchtung der Keime auf Nilblausulfat-Butteragar zu erkennen. Meyer (86) führt die Aromabildung in Rohwürsten ebenfalls auf die Spaltung von Fett und Traubenzucker zurück; die Fettspaltung wies er ebenfalls mit Hilfe des Nilblausulfat-Butteragars nach.

Giolitti (30) untersuchte die Zusammensetzung der Mikroflora während der Rohwurstreifung. Die ermittelten Keime wurden in zwei Gruppen geordnet, eine gemischte und eine aus bekapselten Mikrokokken bestehende Gruppe. Letztere soll die eigentliche Rohwurstflora sein. Veränderungen des Aminosäuregehaltes aufgrund bakterieller Einwirkung konnten nicht festgestellt werden, sodaß die Aromaentstehung auf den Fettabbau zurückgeführt wurde. Auch Zanzucchi und Delindati (129) untersuchten Rohwürste auf das Vorkommen von aromabildenden Keimen. Die gefundenen Mikroorganismen gehörten den Gattungen *Escherichia*, *Achromobacter*, *Aerobacter* und *Pseudomonas* an. Das Aroma sei insbesondere auf dem TurnermEDIUM schnell wahrzunehmen.

Die Lebensdauer der Fettspalter wird durch verschiedene Faktoren eingeschränkt. Lerche (77) hat darauf hingewiesen, daß durch Räucherung und Trocknung fast alle gramnegativen und ein Teil der grampositiven Keime abgetötet werden. Danach seien nur noch Lactobacillen, Mikrokokken und Hefen vorhanden. Aber auch in schwach geräucherten Würsten (Typ Gyulai) sollen (109) die gramnegativen Bakterien nach dem 7. Tag als Folge der chemischen Vorgänge verschwinden (p_H -Senkung, Zunahme der Salzkonzentration). Erikson (24) berichtet, daß nur das Wachstum von Lactobacillen während des Räucherns und dabei erfolgender Temperaturerhöhung und p_H -Senkung weiter vor sich gehe, während Mikrokokken zurückgedrängt und gramnegative Keime stark gehemmt oder abgetötet würden. Ten Cate (110, 112) stellt fest, daß die im Ausgangsmaterial in großer Menge vorhandene "banale" Flora, insbesondere gramnegative Keime, durch Milchsäurebildung und Senkung des Redoxpotentials innerhalb der ersten 3 Tage ausgeschaltet wird. Doch sollen die Lipasen dieser Initialflora, insbesondere von *Pseudomonas*-, *Achromobacter*- und *Alcaligenes*-Keimen, auch nach dem Absterben der Bakterien weiter wirken. Er führt die linear verlaufende Fettsäurebildung auf persistierende Fermentation zurück und meint, daß diese auch das Aroma des Endproduktes beeinflussen. Maillet und Henry (83) prüften den Gehalt von freien Fettsäuren im Fettanteil bei fertig gereiften Rohwürsten; sie vermehrten sich von 0,4 - 0,45 % (berechnet auf Ölsäure) im Ausgangsmaterial auf 2 - 4 %, sogar bis zu 5 - 7 %, während die Jodzahl sich nicht veränderte. Auch die Peroxyd-Zahl stieg während der Reifung nur auf 2 und betrug auch nach zwei Monaten nicht mehr als 2,5 - 3.

Neben den Lipasen der gramnegativen Keime können auch Mikrokokken für die Fettspaltung verantwortlich gemacht werden. Sie sind im Vergleich zur gramnegativen Flora gegenüber Temperaturerhöhung, pH -Senkung, Zunahme der Salzkonzentration unempfindlicher und daher auch in ausgereiften Produkten stets nachzuweisen, wenn auch nicht mehr in dem Ausmaß, wie zu Beginn des Reifungsprozesses (69, 77, 24). Pohja (101 a) berichtet, daß 25 % der von ihm aus Rohwürsten isolierten Mikrokokken lipolytische Aktivität aufwiesen. Guthrie (40) beobachtete beim Trocknen von gesalzenem Fleisch (Charque) das Entstehen eines charakteristischen Geruches, den er auf die Wirkung von Mikrokokken auf das Fett zurückführt.

Lactobacillen sind nicht in der Lage, Eiweiß oder Fett zu spalten (15).

Gelegentlich wird auch über aromabildende Eigenschaften von Keimen berichtet, ohne daß auf das Substrat, in dem die Aromabildung erfolgt, Bezug genommen wird. Zumindest werden die aromabildenden Eigenschaften der Bakterienzelle unmittelbar zugeschrieben. Diese Berichte sollen hier mit aufgenommen werden. Es ist allerdings nicht beabsichtigt, das umfangreiche Schrifttum zu referieren, das sich mit der Aromabildung durch Kohlenhydratabbau befaßt.

McLean und Sulzbacher (85) beimpften Pökellaken mit einem *Pseudomonas*stamm und stellten fest, daß durch das Wachstum dieser Keime das Aroma des gepökelten Fleisches beeinflusst wird. Bei einem Test wurde, mit einer Ausnahme, von allen Personen Fleisch, das in beimpfter Lake gepökelt worden war, dem Fleisch, das aus einer sterilen Lake stammte, vorgezogen. Eine histologische (?) Untersuchung ergab, daß im Inneren von Fleisch, das aus einer gepökelten Lake stammte, keine bakterielle Kontamination zu beobachten war. Die Verfasser schließen daraus, daß Stoffwechselprodukte des *Pseudomonas*stammes aus der Lake in das Fleisch eingedrungen waren.

Kohnle (69) überimpfte aromabildende, gramnegative Stäbchen aus Rohwürsten auf normalen Agar, der bei 12 °C bebrütet wurde; es trat Aromabildung auf, die jedoch nach der dritten Überimpfung verloren ging. Keller (62) beimpfte gewöhnliche Agarnährböden mit 25 Stämmen gramnegativer, nicht sporenbildender Stäbchen, bebrütete bei 12 °C

und stellte bei 14 Stämmen Geruch nach Fruchtestern, bei 6 Stämmen Käsegeruch, bei 2 Stämmen einen Erdbeergeruch, bei 1 Stamm den Geruch edelfauler Weintrauben fest. Nach Lerche (77) verursachen Lactobazillen leicht brennerigen Geruch und Geschmack; Mikrokokken bewirken im allgemeinen angenehmen milchsäureähnlichen Geruch und Geschmack; ein Teil der Stämme weist Geruch und Geschmack nach frischem Brot auf; durch Hefen entsteht in der Wurstmasse leicht säuerlicher Geschmack und fruchtartiges Aroma; Coli-Aerogenes- und Pseudomonasbakterien bewirken säuerlich-gärige Beschaffenheit; Achromobacter erzeugen faulen Geschmack.

Nach Ten Cate (111) sind vor allem die in den ersten 2 Wochen angetroffenen Lancefield D-Streptokokken für das spezifische Aroma der Rohwurst verantwortlich.

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

I. Zur Beeinflussung der Umrötung von Rohwürsten durch Keime

Verschiedene am Institut vorgenommene Untersuchungen hatten ergeben, daß Keime (insbesondere Mikrokokken und Hefen) die Umrötung von Rohwürsten stark fördern. Da aber nicht die Nitratreduktion allein dafür in Frage kam - einerseits war in mit Nitritpökelsalz hergestellten Würsten ebenfalls ein deutlich positiver Einfluß durch Keime festzustellen gewesen und andererseits hatten auch Hefen, die kein Nitrat reduzieren einen beachtlichen, die Umrötung fördernden Einfluß -, wurden verschiedene Untersuchungen vorgenommen, um einen direkten Einfluß von Keimen auf Muskelfarbstoff und Umrötungsvorgang zu studieren.

1. Material und Methodik

Die in den Versuchen verwendeten Keime wurden teils selbst aus Rohwürsten isoliert, teils stammten die Keime aus Untersuchungen von Terplan (114). Die Keime wurden dann auf folgende Eigenschaften geprüft:

- a) Einwirkung auf Muskelfarbstoff
- b) Verhalten in Hämin-Dextrose-Agar und in Hämin-Nitrat-Dextrose-Agar. Der Hämin-Dextrose-Agar wurde von Terplan (114) beschrieben. (Die unter b bis f beschriebenen Versuche wurden gemeinsam mit Terplan vorgenommen.)
- c) Nitratreduktion. 0,05 % KNO_3 enthaltende Nährbouillon wurde mit den Keimen beimpft. Nach 48 stündiger Bebrütung wurde die Nitratreduktion mit dem Reagenz nach Griess-Ilosvay festgestellt.
- d) Oxydase
- e) Methylenblaureduktase. 1 Tropfen einer 1 %igen Methylenblaulösung wurde zu einer 24 Stunden alten Bouillonkultur zugegeben.
- f) Dextrospaltung wurde in einer 0,1 % Glukose enthaltenden Bouillon geprüft. Die Spaltung wurde durch pH -Senkung mittels Bromthymolblau-indikator ermittelt. Ablesung erfolgte nach 1 und 4 Stunden Brutschrankaufenthalt bei 37°C .

2. Ergebnisse

- a) Versuche über die Einwirkung von Keimen auf Muskelfarbstoff.
In diesen Versuchen konnte festgestellt werden, daß die meisten Keime insbesondere Mikrokokken den durch die keimfreie Filtration braun gewordenen Muskelextrakt sehr bald zu reduzieren vermochten, so daß die Extrakte fast ausnahmslos hellrot wurden und die für Oxymyoglobin charakteristischen Maxima bei 543 m und 582 m aufwiesen. Lediglich einige Keime, die sich dann später als oxydasebildend erwiesen, vermochten die Metmyoglobininlösung nicht zu reduzieren.
- b) Einfluß verschiedener Keime auf Häm in unter Berücksichtigung verschiedener fermentativer Eigenschaften dieser Keime.
Die Versuche sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Daraus ist zu entnehmen: Nitratreduktase und Methylenblaureduktase bildende Keime röteten den ursprünglich schmutzig grün-grauen Häminnährboden am stärksten um. Manche Keime verursachten den Farbumschlag nur auf nitrathaltigem, manche auch schon auf ausschließlich dextroshaltigem Nährboden.

Keinen Farbumschlag erzeugten fermentschwache Stämme und/oder Oxydasebildner. Mikrokokken und Hefen bewirkten stärkste Rotfärbung, auch in Abwesenheit von Nitrat. Gramnegative Keime erwiesen sich überwiegend als nicht umrötend.

Tabelle 1

Einfluß verschiedener Keime auf die Farbe von Hämmin-Nitrat-Dextrose- und Hämmin-Dextrose-Agar
im Vergleich mit verschiedenen fermentativen Eigenschaften der Keime

Stamm Nr.	Keimgattung	Hämmin-Nitrat- Dextrose-Agar	Rotfärbung in Hämmin-Dex- trose-Agar	Nitrat- reduktion	Oxydase	Methylenblau- reduktase	Dextrose- spaltung
R 23	Achromobacter	-	-	-	-	-	++
R 34	Achromobacter	-	-	-	++	+	++
R 21	Achromobacter	+	-	-	++	++	-
R 12	Escherichia	-(Gas)	+(Gas)	++	++	++	++(Gas)
R 29	Micrococcus	+	++	+++	++	++	++
R 19	Micrococcus	++	+	+++	-	++	++
R 55	Micrococcus	+++	+	++	+	++	++
R 60	Micrococcus	++(+++)	-	+++	-	+	++
R 9	Micrococcus	++(+++)	+	+++	+	++	++
R 7	Micrococcus	++(+++)	+	++	+	++	++
R 38	Micrococcus	+++	+	++	-	+	-
R 40	Micrococcus	+	-	++	-	+	++
R 43	Micrococcus	-	-	-	-	++	++
R 31	Sarcina	+	-	++	+	+	-
R 24	Brevibacterium	+++	-	++	+	++	-
R 16	Brevibacterium	+(+++)	+	++	+	++	-
Bac. cereus		-	-	-	+	+	++
Debaromyces		++	++	-	+	-	++

Zeichenerklärung: für Rotfärbung und Nitratreduktion:

+++ = stark

++ = mittelgradig

+ = geringgrad. - = negativ

für Oxydase, Reduktase und Dextrospaltung

++ = positiv

+ = zweifelhaft

+ = schwach positiv

- = negativ

II. Versuche über die proteolytische Aktivität von Rohwurstkeimen

Nachdem es als erwiesen gilt, daß die mikrobiellen Vorgänge in der Rohwurst nicht nur zur Umrötung dieser Fleischwaren beitragen, sondern auch charakteristische Geschmacksveränderungen bewirken und geschmacksfördernde Eigenschaften besitzen, sollte in diesem Abschnitt das Vermögen verschiedener Keime zur Proteolyse geprüft werden.

1. Material und Methodik

50 Rohwurststämme, die teils selbst, teils von Terplan (114) aus verschieden gereiften Rohwürsten isoliert und identifiziert worden waren, wurden auf ihr Proteolysevermögen geprüft. Die Erfassung von Proteolyten erfolgte durch das Hydrolysezonenverfahren, das Pohja, Rigler und Niinivaara (103) beschrieben haben. Hierbei gelangt ein fleischhaltiger Nährboden zur Anwendung, um den Verhältnissen in Rohwürsten eher gerecht zu werden, da in den üblichen Nährböden zur Feststellung proteolytischer Vorgänge die Eiweißstoffe (Kasein oder Gelatine) andere Zusammensetzung aufweisen als die Fleischeiweiße. So können Rohwurstkeime Gelatine verflüssigen oder Kasein hydrolysieren, sich aber gegenüber Muskelfleisch indifferent verhalten. Keime, die Fleischeiweiß abbauen, bilden auf dem undurchsichtigen trüben Fleischnährboden um die Kolonie herum eine klare Zone. Je stärker die proteolytische Fähigkeit, desto größer wird der Durchmesser dieser Zone.

Fleischsuspension: Aus Rindfleisch, das 2 - 3 Tage abhängen konnte, wurden möglichst steril 20 g entnommen und mit 80 ml sterilisierter, physiologischer Kochsalz-Lösung homogenisiert (Bühler Homogenisator, Tübingen). Die homogenisierte Fleischsuspension wurde 10 Minuten bei 80 ° C in einem Thermostaten pasteurisiert und danach nochmals aseptisch homogenisiert.

Agar-Substrat: 30 g Agar wurden abgewogen und mit Leitungswasser auf 1000 ml ergänzt. Nach der Verflüssigung wurde der Agar sterilisiert.

Phosphatpuffer- und Mineralsubstrat: 0,3 g KH_2PO_4 , 0,65 g Na_2HPO_4 , 0,1 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0,1 g Pyridoxin, 0,001 g FeCl_3 und 0,05 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$. Die Lösung wurde keimfrei filtriert (Membranfilter Göttingen, Gruppe 6, 150 mm Durchmesser).

Fertiger Nährboden: 45 ml verflüssigter Agar, 45 ml Puffer-Minerallösung und 10 ml Fleischsuspension wurden vermischt. Aufgrund der zugegebenen Phosphate hatten fertige Nährböden einen p_H -Wert von etwa 6,8. Die Schichtdicke des Nährbodens, der in Petri-Schalen ausgegossen wurde, betrug etwa 2 mm.

Züchtung: Die Übertragung der Keime auf den Fleischnährboden erfolgte durch Stichbeimpfung aus 24 Stunden alten Bouillonkulturen. Die Bouillon war ebenfalls nach den Angaben von Pohja und Mitarbeitern (103) hergestellt worden (Fleischextrakt 5,6 g, Hefeextrakt 3,0 g, Pepton 3,0 g, Glukose 1,0 g, KH_2PO_4 4 g, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 6 g und Leitungswasser bis 1000 ml. Der p_H -Wert betrug infolge der zugegebenen Phosphate 6,8). Die Bebrütung der Fleischnährböden erfolgte bei Zimmertemperatur. Nach 2 - 4 Tagen waren, vorausgesetzt, daß der betreffende Stamm proteolytische Aktivität entwickelte, die feinsten Fleischfäserchen in der Umgebung der Kolonie aufgelöst, wodurch eine klare Zone entstand. Unter gleichen Bedingungen gehaltene Kontrollen waren nicht bewachsen. Um Vergleiche ziehen zu können, wurden dieselben Keime auch auf Gelatinenährboden überimpft. Zusammensetzung: 100 ccm Fleischwasser, 1,0 g Pepton, 0,5 g Kochsalz und 13 g Gelatine.

2. Ergebnisse

Die Ergebnisse des Versuchs sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Es ist zu entnehmen, daß die Zahl der Gelatinespalter wesentlich größer ist, als die der "wirklichen Proteolyten".

Deutlichen Fleischabbau zeigte nur	1 Mikrokokkenstamm;
Schwachen Fleischabbau zeigten	1 Brevibakterium,
	4 Mikrokokkenstämme und
	2 Streptokokkenstämme;
Undeutlichen Fleischabbau zeigten	3 Mikrokokkenstämme und
	2 gramnegative Stämme.

Gelatineverflüssigung war bei insgesamt 29 Stämmen zu beobachten.

III. Untersuchungen über lipolytische Aktivität von Rohwurstkeimen und deren Aromabildung auf fett-haltigen Nährböden

Durch mikrobiellen Fettabbau können besonders charakteristische Aromastoffe gebildet werden. Es sollte in diesem Abschnitt geprüft werden, in welchem Ausmaß die Mikroflora dazu befähigt ist, tierisches Fett, das einen wesentlichen Teil der Rohwürste darstellt, abzubauen und besondere Aromastoffe zu produzieren.

1. Material und Methodik

Es wurden dieselben Rohwurststämmen wie in Abschnitt II auf Fettspaltung, Oxydase und Aromabildung in Abhängigkeit von fetthaltigen Nährböden gezeigt.

a) Nachweis hydrolytisch wirkender Keime

In Modifikation des Nilblausulfarbutteragars zum Nachweis lipolytischer Keime in Butter nach Demeter (20) wurde für die Rohwurstkeime statt Butter Schweinefett zugesetzt. Es wurden 50 aus Rohwürsten isolierte Stämme auf Fettspaltung, Oxydase und Aromabildung in Abhängigkeit von fetthaltigen Nährböden geprüft. Außerdem wurde anstelle von Bier- und Preßhefewater YEAST EXTRACT (Difco Laboratories, Detroit) verwendet. Zusammensetzung des Agars: 10 g Hefeextrakt (Difco), 30 g Pepton Witte, 20 g Agar, 1000 ml Aqua dest., p_H -Wert 7 - 7,2. Jeweils 9 ml wurden in Reagenzgläser abgefüllt und an 3 aufeinanderfolgenden Tagen im Dampftopf sterilisiert.

Zur Gewinnung des Schweinefettes wurde schlachtfrischer Rückenspeck ausgebraten. Rückenspeck wurde deswegen benützt, weil in ihm die geringste Enzymwirkung (gegenüber Netzfett und Flomen) beobachtet wurde. Auch ohne Einwirkung von Mikroorganismen kommt es nämlich in Rohfett von Schweinen aufgrund seines bisweilen hohen Enzymgehaltes unter günstigen Bedingungen zu schnell fortschreitender Aufspaltung in Glycerin und freie Fettsäuren (128). Um Veränderungen durch Lichteinflüsse oder Feuchtigkeit während der Lagerung auszuschalten, wurde das Fett sofort nach dem Ausbraten weiter verarbeitet. Die für das ausgebratene Fett ermittelte Säurezahl betrug 1,8 % (berechnet als Ölsäure), während die Jodzahl nach Hanus (7) einen Wert von 44,8 ergab. Diese Zahlen

entsprechen etwa den von Wurziger (128) ermittelten Werten von schlachtfresh ausgebratenen Flomen. 60 ml erwärmtes Schweinefett und 20 ml heißes destilliertes Wasser wurden miteinander vermischt und anschließend 1 ml einer 1 %igen Nilblausulfatlösung zugegeben. Mit 1 n NaOH wurde daraufhin neutralisiert bis Nilblausulfat in der wässrigen Phase gerade noch blau war. Während des anschließenden Erhitzens im Dampftopf, wobei das ganze wiederholt geschüttelt werden mußte, färbte sich das Fett intensiv rot. Das überstehende rotgefärbte Fett wurde in sterile Kölbchen abgefüllt und zwei Mal je 1/2 Stunde sterilisiert. Beim Aufbewahren im Kühlschrank entstand eine violette, fast blaue Farbe, die beim Erwärmen jedoch sofort wieder in Rot umschlug. Vor dem Ausgießen wurde den Agarröhrchen 1 ml der Fett-Nilblausulfatmischung zugegeben, welche im Thermostaten bis in die Nähe des Erstarrungspunktes abgekühlt wurden. Kurz vor dem Erstarren des Agars wurde das Gemisch in gekühlte Petri-Schalen ausgegossen, um einem wiederholt beobachteten Entmischen der Emulsion durch Beschleunigung der Erstarrung weitgehend entgegenzuwirken. Nach dem Ausgießen zeigte der Agar eine blaßrosa Farbe. Die Platten wurden aus Schrägagarkulturen überimpft und über 2 Tage hinweg bei Zimmertemperatur bebrütet. Um Beeinträchtigungen durch Licht auszuschalten, wurden die Platten abgedeckt. Lipolytische Keime erzeugten Blaufärbung ^{x)}, die je nach ihrer Aktivität sich entweder auf den gesamten beimpften Bezirk erstreckte oder nur entlang der Impfstiche zu beobachten war.

b) Nachweis oxydativ wirkender Keime

Beimpfte und bebrütete Emulsionsagarplatten ohne Zusatz von Nilblausulfat wurden mit einer Dimethylenparaphenylendiamin-Hydrochlorid-Lösung überflutet und an Hand der Purpurfärbung der Kolonien das Oxydasebildungsvermögen der Keime nachgewiesen.

x) Das Verhalten von Nilblausulfat gegenüber gesättigten und ungesättigten Neutralfetten und Fettsäuren wurde von mehreren Forschern beschrieben (14, 81, 118). Nilblausulfat ist das Sulfat des Diäthylaminphenonaphtoxazins und besteht aus 2 Farbstoffen, der Oxazin- und der Oxazon-Form. Letztere ist fettlöslich, wobei Rotfärbung des Fettes erfolgt. Die Oxazin-Form des Nilblausulfates reagiert mit den Fettsäuren, wobei eine blaue Farbe entsteht. Nicht hydrolysiertes Fett färbt sich rot, während in teilweise hydrolysiertem Fett Blaufärbung auftritt. Der Farbumschlag ist sehr deutlich und daher leicht zu erkennen (81). Die Anwendung des Nilblausulfates bei der Diagnostik lipolytischer Keime gibt besonders

c) Nachweis von Aromabildung

Schweinefettagar (die Agarzusammensetzung war dieselbe wie bei b) wurde beimpft, 2 Tage bebrütet und die mikrobiell gebildeten Geruchsstoffe von mehreren Personen beurteilt sowie mit bekannten charakteristischen Gerüchen verglichen. Gleichzeitig wurden normale Agarplatten mit denselben Keimen beimpft, um zum Vergleich das Aromabildungsvermögen auf fettfreien Nährböden beurteilen zu können. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

2. Besprechung der Ergebnisse

Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, zeigten alle gramnegativen Keime lipolytische Aktivität (Blaufärbung des Nährbodens), 2 Achromobacter-Stämme waren auf Nilblausulfat-Schweinefettagar nicht gewachsen. 3 Achromobacter-Stämme und der Flavobacterium-Stamm waren deutlich positiv, 2 Achromobacter-Stämme schwach positiv. 2 der Achromobacter-Stämme und das Flavobacterium wiesen gleichzeitig eine Oxydase-Aktivität auf. Unter 28 Mikrokokkenstämmen konnte bei 15 ausgeprägte Lipasewirkung festgestellt werden; 7 Stämme waren nur schwach positiv. Nur einer der Mikrokokkenstämmen entwickelte, wenn auch nur in geringem Maße, Oxydase. Die 4 Brevibakterien-Stämme waren je zur Hälfte deutliche und schwache Lipasebildner. 1 Stamm der Brevibakterien mit schwachem Lipolysevermögen zeigte Oxydase-Aktivität. Sarcina rief keine Farbveränderung hervor. Unter den 8 Streptokokkenstämmen waren 1 deutlich positiver, 1 schwacher und 1 zweifelhafter Lipasebildner.

In den meisten Fällen waren fettsplattende Keime gleichzeitig Aromabildner. Obwohl Aromabildung auch auf normalem Agar beobachtet werden konnte, erfolgte sie auf Fettagar weitaus intensiver und auch mit anderen spezifischen Komponenten. Gramnegative Keime, welche sich als starke Fettspalter erwiesen haben, erzeugten auch sehr intensive Aromen, die als faulig-fruchtig, käsige, Roquefort-artig charakterisiert wurden. Auch bei stark lipolytischen Mikrokokken konnte häufig das Auftreten einer käsigen Geruchskomponente festgestellt werden.

Tabelle 2

Bezeichnung des Stammes		Gattung	Färbbar- keit nach Gram	Agarkultur (Farbe u. Beschaffenheit der Kolonie)	Gelatine- verflüssi- gung	Proteo- lyse	Oxy- dase	Lipolyse	Aromabildung auf Nährböden	
Morphologie									ohne Fett	mit Fett
R 1	K	Micrococcus	+	cremefarben, üppig	+0	-	-	+	ammoniakal., käsig	beißig
R 4	K	Micrococcus	+	zitronengelb	+++	++	+	-	schweflig, stickig	ammoniakalisch
R 5	K	Micrococcus	+	zitronengelb	+0	-	-	+	schweflig, stickig	ammoniakalisch
R 7	K	Micrococcus	+	cremefarben	-	-	-	-	aromat., ammoniakal.	
R 9	K	Micrococcus	+	porzellanfarben	+++	-	-	+	aromatisch	
R 12	Stb	Escherichia	-	bräunlich-glänzend	-	+	-	-		
R 13	kkd Stb	Achromobacter	-	schleimig-glänzend	-	-	++	+++	blumig, käsig	faulig, fruchtig
R 16	Stb	Brevibacterium	+	grüngelb, trocken	+0	-	-	+	schwefl. ammoniakal.	schwefl. ammoniakal.
R 17	Stb	Brevibacterium	+	grüngelb, trocken	++	+	++	+	schwefl. ammoniakal.	ammoniakal., aromat.
R 19	K	Micrococcus	+	porzellan-cremefarben	+++	-	-	++	säuerlich-süßlich	aromat., -säuerlich
R 21	kkd Stb	Achromobacter	-	gelbgrau	-	-	++	+	käsig	aromatisch
R 22	Stb	Flavobacterium	-	gelbgrau	+++	-	-	+++	faulig, fruchtig	käsig, aromatisch
R 23	Stb	Achromobacter	-	cremefarben-schleimig	-	-	-	+	säuerlich	aromat., fruchtig
R 24	Stb	Brevibacterium	+	gelb	+0	-	-	++	schweflig	ammoniakalisch
R 26	Stb	Brevibacterium	+	lindgrün	-	-	-	++	schweflig, stickig	beißig
R 29	K	Micrococcus	+	porzellanfarben	+0	+	-	++	säuerlich	käsig, aromatisch
R 30	Str	Streptococcus	+	gelblich-durchsichtig	-	+	-	+		beißig
R 31	Sar	Sarcina	+	cremefarben	+	-	-	-	säuerlich	ammoniakal, blumig
R 32	K	Micrococcus	+	cremefarben, schleimig	-	+	-	++	ammoniakalisch	fruchtig, faulig
R 34	Stb	Achromobacter	-	schleimig	-	-	++	+++	blumig, stechend	Roquefort-artig
R 35	Stb	Achromobacter	-	gleblich, schleimig	-	-	-	++	faulig, säuerlich	Limburger-artig
R 38	K	Micrococcus	+	kanariengelb	+	-	-	-	schweflig	kein Aroma
R 40	K	Micrococcus	+	porzellanfarben	+++	-	-	+++	säuerlich, käsig	fruchtig, säuerlich
R 43	K	Micrococcus	+	cremefarben	+++	-	-	++	käsig	hefig
R 47	K	Micrococcus	+	cremefarben	+++	-	-	+++	käsig, süßlich	käsig, hefig

Zeichenerklärung:

R (Zahl)	= Nummer des aus Rohwürsten isolierten Stammes
K	= Kokken
Stb	= Stäbchen
kkd Stb	= kokkoide Stäbchen
Str	= Streptokokken
Sar	= Sarcinen

+++	= stark positiv
++	= positiv
+	= schwach positiv
+	= zweifelhaft
-	= negativ
+0	= nur an der Oberfläche positiv (Gelatineverflüssigung)

Tabelle 2 (Fortsetzung)

Bezeichnung des Stammes		Gattung	Färbbar- keit nach Gram	Agarkultur (Farbe und Beschaffenheit der Kulturen)	Gelatine- verflüssi- gung	Proteo- lyse	Oxy- dase	Lipo- lyse	Aromabildung auf Nährböden ohne Fett mit Fett	
Morphologie										
R 50	K	Micrococcus	+	cremefarben, schleimig	-	-	-	++	stickig, ammoniakal.	fruchtig, käsig
R 52	K	Micrococcus	+	porzellanfarben	+++	-	-	+++	kein Aroma	käsig
R 54	K	Micrococcus	+	goldgelb-glänzend	++	+	-	+	ammoniakalisch	ammoniakalisch
R 55	K	Micrococcus	+	porzellanfarben	+++	-	-	-	ammoniakalisch	blumig, ammoniakal.
R 60	K	Micrococcus	+	gelb, schleimig	+	+	-	+	kein Aroma	Romadur-artig
R 61	K	Micrococcus	+	cremefarben bis gelb	+++	-	-	+++	käsig	käsig, fruchtig
R 63	kkd Stb	Achromobacter	-	cremefarben, schleimig	-	-	-	-	aromatisch, fruchtig	
R 68	Str	Streptococcus	+	gelblich-durchsichtig	-	-	-	-		
R 70	K	Micrococcus	+	porzellanfarben	+0	+	-	+++	kein Aroma	blumig, aromatisch
R 73	Str	Streptococcus	+	gelblich-durchsichtig	-	-	-	-		
R 75	K	Micrococcus	+	cremefarben	+++	-	-	+++	käsig	aromatisch, fruchtig
R 77	K	Micrococcus	+	cremefarben	+++	-	-	++	brenzlich	acetonartig
R 78	K	Micrococcus	+	porzellanfarben	++	+	-	+	kein Aroma	Fäkalgeruch
R 81	K	Micrococcus	+	schwaches Wachstum	-	-	-	-	kein Aroma	
R 83	K	Micrococcus	+	cremefarben	+++	-	-	++	käsig	käsig, aromatisch
R 84	K	Micrococcus	+	cremefarben	+++	-	+	++	käsig, schweflig	aromatisch
R 85	Stb	Achromobacter	-	cremefarben, schleimig	-	+	-	-	kein Aroma	
R 91	K	Micrococcus	+	cremefarben	+0	-	-	++	blumig, käsig	fruchtig
R 94	Str	Streptococcus	-	gelblich-durchsichtig	-	-	-	+	kein Aroma	kein Aroma
R 95	Str	Streptococcus	+	gelblich-durchsichtig	-	-	-	-	kein Aroma	kein Aroma
R 99	K	Micrococcus	+	cremefarben	+	-	-	+	blumig, käsig	ammoniakal., frucht.
R 104	Str	Streptococcus	+	gelblich-durchsichtig	-	-	-	++	kein Aroma	aromatisch
R 105	Str	Streptococcus	+	gelblich-durchsichtig	-	-	-	-	kein Aroma	kein Aroma
R 107	K	Micrococcus	+	goldgelb-schleimig	+	-	-	-	kein Aroma	
R 108	Str	Streptococcus	+	gelblich-durchsichtig	-	+	-	-	kein Aroma	

Zeichenerklärung:

R (Zahl) = Nummer des aus Rohwürsten isolierten Stammes
 K = Kokken
 Stb = Stäbchen
 kkd Stb = kokkoide Stäbchen
 Str = Streptokokken
 Sar = Sarcinen

+++ = stark positiv
 ++ = positiv
 + = schwach positiv
 ± = zweifelhaft
 - = negativ
 +0 = nur an der Oberfläche positiv
 (Gelatineverflüssigung)

D. DISKUSSION

Die Tatsache, daß Keime Umrötung und Farbhaltung von Rohwürsten auch noch in anderer Weise als über die Nitratreduktion fördern, gab Veranlassung, im Rahmen dieser Untersuchungen die direkte Einwirkung von Rohwurstkeimen auf Muskelextrakt und Hämin zu prüfen.

Die Feststellung verschiedener Autoren, insbesondere im medizinischen Schrifttum, daß viele Keime befähigt sind, den Blutfarbstoff aus der oxydierten Form in die reduzierte oder oxygenierte zu überführen, konnte teils an Muskelextrakten, und zwar auch spektralphotometrisch, teils in Versuchen an Hämin-Dextrose-Agar mit und ohne Nitratzusatz bestätigt werden. In den Nährböden wurde das braune Hämin vermutlich in Häm oder sogar in Hämochromogen übergeführt, da die Rotfärbung des Nährbodens für eine Reduktion des dreiwertigen Eisens spricht. Hier waren es Mikrokokken, Brevibakterien und Hefen, welche diese Eigenschaften aufwiesen. Mikrokokken entfalteten auch in Muskelextrakten deutlich reduzierende Eigenschaften. Diese Wirkung der Keime beruht auf dem mikrobiellen Sauerstoffverbrauch, wie er im Schrifttum verschiedentlich erwähnt wurde (12, 104, 119). Die Senkung des Redoxpotentials ist nicht nur für den Umrötungsvorgang eine notwendige Voraussetzung, vielmehr wird dadurch auch der umgerötete Muskelfarbstoff vor Oxydationen geschützt, ebenso das nicht an Stickoxyd gebundene Myoglobin, eventuell auch Hämochromogene, so daß die rote Farbe der Würste beständiger wird.

Nicht nur Umrötung und Farbhaltung werden durch mikrobiologische Vorgänge bedingt oder unterstützt, auch der Geschmack wird durch die Aktivität verschiedenartiger Keime charakteristisch beeinflusst. Da die typischen Geschmacksstoffe in Rohwürsten - von Gewürzen und Salz abgesehen - überwiegend aus den Hauptbestandteilen Eiweiß, Fett und Kohlenhydraten entstehen müssen, wurden aus Rohwürsten isolierte Keime auf Proteolyse und Lipolyse untersucht. Hinsichtlich des Abbaus von Kohlenhydraten soll auf die von Terplan (114) gesichtete Literatur verwiesen werden.

Die Untersuchungen ergaben, daß mehr als die Hälfte der geprüften Keime Gelatine verflüssigte, daß aber nur rund 1/5, wenn zum Teil auch nur

undeutlichen, Fleischabbau zeigten, darunter einige Mikrokokken, Streptokokken, Brevibakterien und gramnegative Stäbchen. Über das proteolytische Verhalten von Mikrokokken und Bacillus-Stämmen hatten schon Pohja und Niinivaara (101, 102) berichtet. Sie konnten aus 137 Mikrokokkenstämmen 16 "Fleischproteolyten" isolieren. Wesentlich ist aber, daß neben den Mikrokokken auch andere Keime, wie Streptokokken und in geringem Umfang auch gramnegative Keime proteolytisch wirken, wie dies in eigenen Untersuchungen gezeigt werden konnte. Dies ist umso bemerkenswerter, als bei vielen Herstellungsverfahren anfangs gramnegative Keime reichlich vorhanden sind, dann jedoch abnehmen, und bei bestimmten Verfahren gerade Streptokokken reichlich vertreten sind (110). Mikrokokken sind ohnehin bei fast allen Verfahren zu finden. Die Fragen der mikrobiellen Proteolyse bei Rohwürsten müssen daher immer unter Berücksichtigung der Herstellungsart diskutiert werden, sofern die Proteolyse durch Keime nicht überhaupt abgelehnt wird. So sind Erklärungen für die Zunahme des Aminostickstoffes während der Rohwurstreifung unterschiedlich. Einzelne Autoren begründen das Anwachsen des Aminostickstoffes nur mit der Aktivität von Fleischenzymen (83, 30), andere mit mikrobiell-enzymatischen Vorgängen (8, 100). Pezacki und Duda (100) machten die Beobachtung, daß die größte Intensität der proteolytischen Vorgänge mit einer starken Vermehrung der Mikroflora zusammenfiel.

Eine bakterielle Einwirkung auf Fleischiweiß sollte schon deswegen nicht ganz in Abrede gestellt werden, als bestimmte Aminosäuren bei der Rohwurstreifung in stärkerem Maße zunehmen als bei der Fleischreifung (83), was teilweise ebenfalls zum Entstehen des typischen Rohwurstaromas beitragen mag. Inwieweit bakterielle Proteolyse und enzymatische Vorgänge miteinander verkoppelt sind, soll weiteren Untersuchungen vorbehalten sein.

Innerhin muß zu der Methodik noch eine Einschränkung gemacht werden. Da wesentliche Bestandteile, wie Salz, Salpeter und Nitrit dem Nährmedium nicht zugesetzt wurden, fehlten im Nährboden, der ohnehin nie ein zufriedenstellendes Modell darstellt, Faktoren, die das proteolytische Verhalten entscheidend beeinflussen.

Ähnliches gilt auch für die Zusammensetzung des Nilblausulfat-Schweinefettmediums für den Nachweis fettspaltender Rohwurstkeime. Einerseits konnte zwar eine besondere Hemmwirkung durch Nilblausulfat gegenüber Mikro- und Streptokokken (81) nicht festgestellt werden, andererseits war

auch in diesen Versuchen der Nährboden nicht dem Salz-, Salpeter- und Nitritgehalt von Rohwürsten angepaßt worden, so daß die Fettspaltung unter diesen Gesichtspunkten zu bewerten ist,

Die gramnegativen Keime erwiesen sich als stärkste Fettspalter. Wenn- gleich von mehreren Autoren (24, 77, 94, 95, 109, 110, 112) auf das frühe Absterben dieser Keime während der Reifung hingewiesen wurde, so sollen nach anderer Auffassung die Fermente der abgestorbenen Keime das lineare Ansteigen der Fettsäuren im Verlauf der Rohwurstreifung erklären (112). Allerdings kann es auch auf das in den Versuchen festgestellte Fetts- palungsvermögen anderer Keime, insbesondere der Mikrokokken, zurück- geführt werden. Wenn diese auch im Verlaufe der Reifung, besonders durch Raucheinwirkung beträchtlich abnehmen, so sind sie doch in fertigereiften und gelagerten Rohwürsten stets vorzufinden (24, 77, 94, 95).

Beachtlich war bei diesen Versuchen, daß gerade bei mit gramnegativen Keimen beimpften Nährböden charakteristische Geruchsstoffe auftraten, so daß diesen Keimen hinsichtlich der Aromabildung erhebliche Bedeutung zukommt, wie dies bereits von verschiedenen Autoren (69, 86, 94, 129) herausgestellt worden ist. Aber auch bei den Mikrokokken war zum Teil starke Aromabildung festzustellen.

Hervorzuheben ist, daß die Aromabildung auf fetthaltigen Nährböden inten- siver und andersartig verlief als auf fettfreien Kontrollen, womit zwar auch eine Aromabildung durch andere Stoffe angedeutet ist, aber im wesentlichen die Bedeutung der Lipolyse klargestellt wird. Auf einen weiteren Umstand muß noch hingewiesen werden: Da durch Lipasen allein nur Fettsäuren frei- gesetzt werden, müssen Aromaunterschiede auf weitere mikrobiell bedingte Veränderungen an Fettsäuren zurückgeführt werden.

E. ZUSAMMENFASSUNG

1. Bei der Besprechung des Schrifttums wurden Aufbau sowie Wirkung von Keimen auf Muskelfarbstoff, Fleischiweiß und Fett unter Berücksichtigung mikrobieller Vorgänge in Rohwürsten diskutiert.
2. In eigenen Untersuchungen wurde die Einwirkung von Keimen auf Muskelextrakte, Hämin sowie fleisch- und fetthaltige Nährböden im Hinblick auf die Rohwurstreifung studiert.
3. Bestimmte Keime, insbesondere solche mit Nitrat- und Methylenblaureduktasen sind aufgrund ihrer fermentativen Eigenschaften befähigt, die Umrötung zu fördern.
4. Nur wenige der geprüften Keimarten bauten Fleischiweiß ab. Die mikrobielle Proteolyse dürfte daher von der Förderung oder Hemmung der einzelnen Keimarten bei der Reifung abhängen.
5. Zahlreiche Keime wiesen lipolytische Aktivität auf; ein Teil davon war zur Bildung charakteristischer Aromastoffe befähigt.

F. LITERATURVERZEICHNIS

1. Anson, M.L.,
und A.E. Mirsky: On the combination of nitric oxide with
haemoglobin.
J. Physiol. 60 (1925), 100;
2. Barnard, R.D.: The reactions of nitrite with hemoglobin
derivates.
J. Biol. Chem. 120 (1937), 177;
3. Bartels, H.,
und K. Coretti: Erfahrungen bei der Untersuchung von Rohwurst-
fehlfabrikaten.
Fleischwirtschaft 13 (1961), 539, 639, 14
(1962), 87;
4. Bauernfeind, J.C.: The use of ascorbic acid in processing foods.
Adv. in Food Res. 4 (1953), 359;
5. Bernheim, F.,
und M. Dixon: XVIII. The reduction of nitrates in animal
tissues.
Biochem. J. 22a (1928), 125;
6. Bianchi, E.: Sul contenuto in istamina ed istidina di salami
del commercio tipo felino "S" ed "S.B.".
Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 33 (1957), 1702;
- 6a. Bianchi, E.: Quadri cromatografici di aminoacidi nell'
impasto di salami di tipo felino "S.B.".
Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 33 (1957), 1706;
7. Beythien - Diemair: Laboratoriumsbuch für den Lebensmittelchemiker.
Verlag von Theodor Steinkopff, Dresden und
Leipzig, 1957;
8. Böhm, A.: Untersuchungen an Pökelfilfsstoffen.
Fleischwirtschaft 7 (1955), 383;

9. Brooks, J.: The action of nitrite on hemoglobin in the absence of oxygen.
J. Roy. Soc. of London B 123 (1937), 368;
10. Brooks, J.: Changes in muscle pigments.
Report of the Food Investigation Board 1937, 19;
11. Brooks, J.: Color of Meat.
Food Research 3 (1938), 75;
12. Brown, W.D.,
und A.L. Tappel: Pigment-antioxydant relationships to meat-colour stability.
Proceedings of the Tenth Research Conference,
American Meat Institute Foundation, University
of Chicago, March 27 - 28, 1958, S. 81;
13. Castell, C.H.,
und E.H. Garrard: "Oxydase reaction" of bacteria on relation to dairy products.
Food Res. 5 (1940), 215;
14. Collins, M.A.,
und B.W. Hammer: The action of certain bacteria on some simple tri-glycerides and natural fats as shown by nil-blue sulphate.
J. Bacteriol. 27 (1934), 473;
15. Coretti, K.: Rohwurstfehlfabrikate durch Lactobazillen.
Fleischwirtschaft 10 (1958), 218;
16. Coretti, K.: Gehäuftes Auftreten von Kernverfärbungen bei Rohwürsten.
Fleischwirtschaft 10 (1958), 829;
17. Coretti, K.: Fermentative Eigenschaften der aus Rohwurst isolierten Lactobazillen.
Jahresber. d. Bundesforschungsanst. f. Fleischwirtschaft 1958, S. 31;
18. Cutchins, E.C.,
R.N. Doetsch und
M.J. Pelczac: The influence of medium composition on the production of bacterial lipase.
J. Bacteriol. 63 (1952), 269;

19. Deibel, R.H.,
und J.B. Evans:
"Nitrit burn" in cured meat products -
Particular in fermented sausages.
American Meat Institute Foundation Bulletin
No. 32, September 1957;
20. Demeter, K.J.:
Mikrobiologie der Butter.
Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart 1956;
21. Duisberg, P.C.,
und R.C. Miller:
Relation of hydrogen-ion concentration to
color developed in cured pork.
Food Research 8 (1943), 78;
22. Eddy, B.P.:
The effects of salt concentration and tem-
perature on nitrite production and metabolism.
Proceedings on the Second International
Symposium on Food Microbiology, Cambridge
1957, S. 87;
23. Entel, H.J.:
Weitere Untersuchungen über das Vorkommen
von Blastomyceten in Rohwürsten.
Berl.Münch. Tierärztl. Wschr. 69 (1956),
400;
24. Erikson, B.:
Studies on the microbial flora in Swedish
dry sausages.
Referat auf der 6.Tagung Europ. Fleischfor-
scher in Utrecht, 29.8. - 3.9.1960,
Bericht Nr. 4;
25. Fischbach, K.:
Untersuchungen über das Auftreten der Pökel-
röte unter sterilen Bedingungen.
Vet. med. Diss., Gießen 1956;
26. Gale, E.F.:
The production of amines by bacteria.
The decarboxylation of amino-acids by
strains of Bacterium Coli.
Biochemical. J. 34 (1940), 392;

27. Ginger, I.D.,
Wilson, G.D.
und B.S.Schweigert: Biochemistry of myoglobin.
Quantitative determination in beef and pork
muscle.
J. Agric. Food Chem. 2 (1954), 1037;
28. Ginger, I.D.,
und B.S.Schweigert: Biochemistry of myoglobin.
Chemical studies with purified metmyoglobin.
J. Agric. Food Chem. 2 (1954), 1037;
29. Ginger, I.D.,
J.P. Wachter,
D.M. Doty,
B.S. Schweigert,
F.J. Beard,
J.C. Pierce,
und O.G. Hankins: Effect of aging and cooking on the distribution
of certain amino acids and nitrogen in beef
muscle.
Food Res. 19 (1954) 410;
30. Giolitti, G.: Ricerche sul processo di maturazione degli
insaccati.
Archivio Veterinario Italiano 11 (1960), 23;
31. Gißke, W.: Probleme der Rohwurstherstellung.
Fleischwirtschaft 8 (1956), 176;
32. Goldman, M.L.,
und M.M. Rayman: Hydrolysis of fats by bacteria of the
Pseudomonas genus.
Food Res. 17 (1952), 326;
33. Gorini, C.,
W. Grassmann und
H. Schleich: Über die Proteinasen der Acidoproteolyten.
Hoppe-Seyler's Zschr. Physiol. Chemie 205
(1932), 133;
34. Grau, R.: Die Verwertung von Zucker bei der Fleisch-
warenherstellung.
Fleischwirtschaft 7 (1955), 182;
35. Grau, R.: Fleisch und Fleischwaren.
Verlag A.W. Hayn's Erben, Berlin 1960;

36. Grau, R.: Die biochemischen Vorgänge während der Fleischreifung.
VI. Symposium sur les Matières Etrangères dans les Aliments.
Madrid, Octobre 1960;
37. Grau, R.,
und A. Böhm: Über die Wirkung von Ascorbinsäure bei der Brühwurstherstellung.
Fleischwirtschaft 10 (1958), 23;
38. Grau, R., und
A. Böhm: Die freien Aminosäuren des frischen und gepökelten Fleisches.
Jahresber. d. Bundesforschungsanst. f. Fleischwirtschaft, 1957, 87;
39. Greenwood, D.A.,
W.L. Lewis,
W.M. Urbain und
L.B. Jensen: The heme pigments of cured meats.
IV. Role of sugars in color of cured meats.
Food research 5 (1940), 625;
40. Gutheil, N.C.: Micrococci of brine and dry cured salt beef (Charque).
Proceedings of the Second International Symposium on Food Microbiology,
Cambridge 1957, S. 183;
41. Gutmann, H.R.,
Jandorf, B.J.
und O. Bodansky: The role of pyridine nucleotides in the reduction of methemoglobin.
J. Biol. Chem. 169 (1947), 145;
42. Haag, F.E.: Die Zersetzung der Fette durch Bakterien.
Arch. Hyg. 100 (1928), 271;
43. Haarmann, W.,
und E. Schroeder: Über den Einfluß von spezifisch wirkenden Mitteln auf die postmortale Autolyse.
Biochem. Zschr. 296 (1938), 131;
44. Hamm, R.: Fleischfarbe und Pökelprozeß.
Dt. Lebensmitt. Rdsch. 50 (1954), 134;

45. Haurowitz, F.: Zur Chemie des Blutfarbstoffes.
4. Mitt., Über das Sulfhämoglobin (nebst Nach-
trägen zu den früheren Mitteilungen).
Hoppe-Seyler's Zschr. Physiol. Chemie 151
(1926), 130;
46. Hoffmann-Ostenhof, O.: Enzymologie.
Springer Verlag, Wien 1954;
47. Hornsey, H.C.: The colour of cooked cured pork.
I. Estimation of the nitric oxide-haem pigments.
J. Sci. Food Agric. 7 (1956), 534;
48. Hornsey, H.C.: The colour of cooked cured pork.
III. Distribution and relationship of pigments,
pH and cysteine.
J. Sci. Food Agric. 10 (1959), 114;
49. Ingram, M.: Changes in the nitrite-content of small samples
of tank-pickle.
Report of the Food Investigation Board 1937, 66;
50. Jakob, A.: Über den Abbau von Blutfarbstoff zu Porphyrinen
durch Reinkulturen von Bakterien und über eine
neue biologische Synthese von Koproporphyrin
III. Klin. Wschr. 18 (1939), 1024;
51. Janke, A.,
und H. Holzer: Probleme des Stickstoffkreislaufs. II.
Weitere Untersuchungen über das proteolytische
Vermögen der Mikroben.
Biochem. Zschr. 226 (1930), 243;
52. Jensen, L.B.: Microbiology of meats.
3. Aufl., The Garrard Press Publishers,
Champaign, Illinois 1954;
53. Jensen, L.B.,
und D.P. Grettie: Action of microorganisms on fat.
Food Res. 2 (1937), 97;

54. Jensen, L.B.,
und W.M. Urbain:
Bacteriology of green discoloration in meats
and spectrophotometric characteristics of the
pigments involved.
Food Res. 1 (1936), 263;
55. Kämmerer, H.:
Bakterien und Blutfarbstoff.
Arch. Exp. Path. und Pharm. 88 (1920), 247;
56. Kämmerer, H.:
Über das durch Darmbakterien gebildete
Porphyrin und die Bedeutung der Porphyrinprobe
für die Beurteilung der Darmfäulnis.
Dt. Arch. Klin. Med. 145 (1924), 257;
57. Kampschmidt, R.F.:
Effect of wave length of light on discoloration
of cured meats.
J. Agric. Food Chem. 3 (1955), 510;
58. Karpati, G.:
Einige Fragen über die Reifung der mittels
Salzung und Trocknung konservierten Wurst-
waren.
Bericht Nr. 32 der 7. Tagung Europäischer
Fleischforscher, Warschau, September 1961;
59. Kaufmann, F.C.,
J.W. Harlan,
G.D. Lee,
M.D. Wilding und
R.D. Beckstrom:
Gas chromatography for meat flavor research.
Proceedings of the Twelfth Conference.
American Meat Institute Foundation.
Circular No. 61, July 1960;
60. Keilin, D.,
und E.F. Hartree:
Reaction of nitric oxide with hemoglobin
and meat-hemoglobin.
Nature (London) 139 (1937), 548;
61. Kelch, F., und
R. Heidtmann:
Über den Einfluß von Recorbin auf die Qua-
lität von Brühwurst und schnittfester Rohwurst.
Fleischwirtschaft 12 (1960), 97;
62. Keller, H.:
Die bakterielle Aromatisierung der Rohwurst.
Fleischwirtschaft 6 (1954), 125;

63. Keller, H.: Versuche zur bakteriellen Aromatisierung der Rohwurst.
Fleischwirtschaft 6 (1954), 453;
64. Keller, H.,
und E. Meyer: Bakterielle Aromatisierung der Rohwurst.
Fleischwirtschaft 6 (1954), 453;
65. Kemp, J.D.,
W.G. Moody und
J.L. Goodlet: The effect of smoking and smoking temperatures
on the shrinkage, rancidity development,
keeping quality, and palatability of dry cured
hams.
Food Technol. 15 (1961), 267;
66. Kiese, M.: Die Reduktion des Hämoglobins.
Biochem. Zschr. 316 (1944), 264;
67. Kiese, M., und
H. Kaeske: Verbindungen des Muskelhämoglobins.
Biochem. Zschr. 312 (1942), 121;
68. Körmendy, L.,
und G. Gantner: Über freie Aminosäuren bei der Rohwurstreifung.
Fleischwirtschaft 14 (1962), 774;
69. Kohnle, K.: Untersuchungen über aromabildende und halo-
phile Bakterien in der Rohwurst.
Vet. med. Diss., Gießen 1953;
70. Kotter, L.: Rinderbacken als Ursache für Fehlfabrikate bei
der Wursterstellung.
Der fleischverarbeitende Betrieb 1953, Nr. 7;
71. Kotter, L.: Grundsätzliches über das Wesen des Pökeln.
Vieh- und Fleischwirtschaft 1954, 157;
72. Kristoffersen, T.,
und F.E. Nelson: Degradation of amino acids by lactobacillus
casei and some factors influencing deamination
of serine.
Appl. Microbiol. 3 (1955), 268;

73. Lagerborg, V.A.,
und W.E. Clapper: Amino acid decarboxylases of lactic acid
bacteria.
J. Bacteriol. 63 (1952), 393;
74. Landmann, A.,
und R. Margolis: Investigation of beef muscle cathepsins.
American Meat Institute Foundation,
Circular No. 65, June 1961;
75. Lang, K.: Lactobazillen bei der Fäulnis von Rohwurst.
Fleischwirtschaft 12 (1960), 97;
76. Lerche, M.: Mikroben in der Rohwurst.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 69 (1956), 91;
77. Lerche, M.: Mikrobiotische Vorgänge bei der Rohwurstreifung.
Fleischwirtschaft 8 (1956), 752;
78. Lerche, M.: Mikrobiotische Vorgänge bei der Rohwurstreifung.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 70 (1957), 13;
79. Lerche, M., und
H. Lammers: Die Hefen der Rohwurst.
Arch. Lebensmittelhyg. 6 (1955), 93;
80. Locker, R.H.: Proteolysis in the storage of beef.
J. Sci. Food Agric. 11 (1960), 520;
81. Long, H.F., und
B.W. Hammer: Methods for the detection of lipolysis by
Microorganisms.
Jowa St. College J. Sci. 11 (1936/37), 343;
82. Losem, P.: Versuche zur Verbesserung von Dauerwurst
durch Aromabakterien.
Vet. med. Diss., Gießen 1956;
83. Maillet, J., und
M. Henry: Etude de quelques produits de la protéolyse
et de la lipolyse dans le saucisson cru.
VI^e Symposium sur les Matières Etrangères
dans les Aliments, Madrid, Octobre 1960;

84. Maschmann, E.: Über Bakterienproteinasen I.
Biochem. Zschr. 294 (1937), 1;
85. Mc Lean, R.A., Production of flavor in cured meat by a
und W.L. Sulzbacher: bacterium.
Appl. Microbiol. 7 (1959), 2;
86. Meyer, E.: Versuche zur bakteriellen Aromatisierung von
Rohwürsten.
Vet. med. Diss., Gießen 1954;
87. Millikan, G.A.: Muscle Hemoglobin.
Phys. Reviews 19 (1939), 503;
88. Mills, F., The effect of sugar on the flavor and color
C.E. Weir und of smoked hams.
G.D. Wilson: Food Technol. 14 (1960), 94;
89. Mukherjee, S.: Studies on degradation of fats by microorganisms.
I. Arch. Biochem. Biophys. 33 (1951), 364;
90. Nashif, S.A., The extracellular lipases of some gramnegative
und F.E. Nelson: non-sporeforming rodshaped bacteria.
J. Dairy Sci. 36 (1953), 698;
91. Neill, J.M.: I. The changes induced by Pneumococci and
by sterile animal tissue.
J. Exp. Med. 41 (1925), 299;
92. Neill, J.M.: II. The oxydation of hemoglobin and reduction
of methemoglobin by anaerobic bacilli and by
sterile plant tissue.
J. Exp. Med. 41 (1925), 535;
93. Niinivaara, F.P.: Über den Einfluß von Bakterienreinkulturen auf
die Reifung und Umrötung der Rohwurst.
Acta Agralia Fennica 85;
94. Niinivaara, F.P., Über die Reifung der Rohwurst.
und M.S. Pohja: I. Mitteilung. Zschr. Lebensmitt. -Unters. 104
(1956), 413;

95. Niinivaara, F.P.,
und M.S. Pohja: Über die Reifung der Rohwurst. II.
Aus Rohwurst isolierte Bakterienstämme und
ihre Bedeutung beim Reifungsprozeß.
Zschr. Lebensmitt.-Unters. 106 (1957), 187;
96. Niinivaara, F.P.,
M.S. Pohja und
S.E. Komulainen: Über die chemischen Veränderungen in der
Rohwurst während der Reifung, insbesondere
über die Veränderungen der stickstoffhaltigen
Substanzen.
Bericht Nr. 31 der 7. Tagung Europäischer
Fleischforscher, Warschau, September 1961;
97. Niven, C.F.: Sausage discolorations of bacterial origin.
American Meat Institute Foundation, Bulletin
No. 13, December 1951;
98. Pezacki, W.: Die Farbveränderungen der Rohwürste und
ihre objektive Messung.
Referat, gehalten auf der 6. Tagung Europäi-
scher Fleischforscher in Utrecht, 29.8.-3.9.1960;
99. Pezacki, W.: Die technologisch beeinflussbaren Farbverände-
rungen bei Rohwürsten.
Fleischwirtschaft 13 (1961), 390;
100. Pezacki, W.,
und Z. Duda: Die Veränderungen von organischen Stickstoff-
verbindungen in der Rohwurst.
Bericht Nr. 35 der 7. Tagung Europ. Fleisch-
forscher, Warschau, September 1961;
101. Pohja, M.S., und
F.P. Niinivaara: Die Bedeutung einiger stark proteolytischer
zur Gattung *Bacillus* gehöriger Stämme.
Fleischwirtschaft 12 (1960), 932;
- 101a. Pohja, M.S.: Micrococci in fermented meat products.
Acta Agralia Fennica 96, 1960;
102. Pohja, M.S., und
F.P. Niinivaara: Untersuchungen über das Vermögen einiger
Micrococcus- und *Bacillus*-Stämme, Gelatine,
Kasein und Fleischeiweiß abzubauen.
Fleischwirtschaft 13 (1961), 52;

103. Pohja, M.S.,
F. Rigler und
F.P. Niinivaara: Ein Verfahren zum Nachweis der Proteolyse
im Fleisch.
Sixth Meeting of Meat Research Institutes,
Utrecht, August 29th - September 3rd 1960;
104. Robach, D.L.,
und R.N. Costilow: Role of the bacteria in the oxydation of
myoglobin.
Appl. Microbiol. 9 (1961), 529;
- 104a. Schönberg, F.: Prüfung von Rohwurstfehlfabrikaten in filtrier-
tem UV-Licht unter besonderer Berücksichtigung
der Porphyrinbildung.
Fleischwirtschaft 8 (1956), 185;
105. Schormüller, J.,
und G. Adler: Die Stickstoffbilanz bei natürlicher und künst-
licher Reifung.
Zschr. Lebensmitt.-Unters. 109 (1959), 13;
106. Shenk, J.H.,
J.L. Hall und
H.H. King: Spectrophotometric characteristics of hemoglobins.
Beef blood and muscle hemoglobins.
J.Biol. Chem. 105 (1934), 741;
107. Snoke, J.E.,
und H. Neurath: The proteolytic activity of striated rabbit muscle.
J.Biol.Chem. 187 (1950), 127;
108. Souci, S.W.: Verwendung von Ascorbinsäure bei der Her-
stellung von Fleischwaren.
Fleischwirtschaft 10 (1958), 452;
109. Tabacs, J.,
und E. Zukal: Data concerning the microbiological and
chemical changes of Gyulai type sausages in
course of their ripening.
Bericht Nr. 47 der 7. Tagung Europ. Fleisch-
forscher, Warschau, September 1961;
110. Ten Cate, L.: De Microbiologie der "Geschwitzte" Snijworst.
Tijdschr. Diergeneesk. 85 (1960), 743;
111. Ten Cate, L.: Het Aroma der Snijworst.
Tijdschr. voor Diergeneesk. 85 (1960), 859;

112. Ten Cate, L.: De lipasen der snijworst.
Tijdschr. Diergeneesk. 85 (1960), 999;
113. Ten Cate, L.: Das Schwitzen von Rohwurst.
Fleischwirtschaft 12 (1960), 1038;
114. Terplan, G.: Biologische, chemische und physikalische Vorgänge bei der Herstellung von gepökelten und gereiften Fleischwaren.
Abhandlung zur Erlangung der Venia legendi.
Aus dem Institut für Nahrungsmittelkunde der Tierärztlichen Fakultät München;
115. Theorell, H.: I. Mitt. Kristallisieren und Reinigung des Myoglobins sowie vorläufige Mitteilung über sein Molekulargewicht.
Biochem. Zschr. 252 (1932), 1;
116. Theorell, H.: III. Mitt. Kristallinisches Myoglobin.
Die absolute Lichtabsorption von Oxy-, Carboxy-, Meta- und reduziertem Myoglobin.
Biochem. Zschr. 268 (1933), 55;
117. Theorell, H.: Heme-linked groups and mode of action of some hemoproteins.
Advances Enzymol. 7 (1947), 265;
118. Turner, R.H.: The action of bacteria on fat.
J. Inf. Diss. 44 (1929), 126;
119. Urbain, W.M., und D.A. Greenwood: The heme pigments of cured meats. II.
An application of the van Slyke-Neill manometric gas apparatus to the determination of oxygen capacity of dilute hemoglobin solutions.
Food Research 5 (1940), 607;
120. Van der Zant, W.C., und F.E. Nelson: Characteristics of an endocellular proteolytic enzyme system of Streptococcus lactis.
J. Dairy Sci. 36 (1953), 1212;

121. Virtanen, I.A.,
und I. Tarnanen:
Die Sekretion und Thermostabilität der Bakterienproteinasen.
Hoppe-Seyler's Zschr. Physiol. Chem. 204
(1932), 247;
122. Warburg, O.,
und W. Christian:
Über die Aktivierung der Robinschen Hexose-Mono-Phosphorsäure in roten Blutzellen und die Gewinnung aktivierender Fermentlösungen.
Biochem. Zschr. 242 (1931), 206;
123. Warburg, O.,
F. Kubowitz und
W. Christian:
Über die katalytische Wirkung von Methylenblau in lebenden Zellen.
Biochem. Zschr. 227 (1930), 245;
124. Watts, B.M.:
.Oxydative rancidity and discoloration in meat.
Advances Food Res. 5 (1954), 1;
125. Watts, B.M.,
A.M. Erdmann und
J. Wentworth:
Relation of free sulfhydryl groups to cured meat color.
J.Agric. Food Chem. 3 (1955), 147;
126. Watts, B.M.,
und B.T. Lehmann:
Ascorbic acid and meat color.
Food Technol. 6 (1952), 194;
127. Winkler, C.A.,
und J.W. Hopkins:
Canadian Wiltshire Bacon. XII.
Effect of heat treatment on the colour stability of bacon.
Can. J. Res. 18, Sec. D. (1940), 289;
128. Wurzinger, J.,
und E. Lindemann:
Über die Bedeutung der Säurezahl für die Beurteilung von Schweineschmalz.
Fleischwirtschaft 10 (1958), 152;
129. Zanzucchi, A.,
und G. Delindati:
Studie su alcuni stipiti batterici produttori di aroma, isolati da insaccati durante i processo di maturazione.
Industria Conserve 30 (1955), 167;

130. Zanzucchi, A.,
und G. Delindati: Sull'influenza della flora batterica nei
processi di maturazione degl'insaccati.
Industria Conserve 32 (1957), 3;
131. Zeller, M.: Laktobazillen als Erreger der Grünverfärbung
bei Brühwürsten.
Arch. Lebensmittelhyg. 8 (1957), 195;
132. ZoBELL, C.E.: Factors influencing the reduction of nitrates
and nitrites by bacteria in semi solid media.
J. Bacteriol. 24 (1932), 273.

Am Ende meiner Arbeit erlaube ich mir, Herrn
Professor Dr. L. Kotter für die freundliche Über-
lassung des Themas herzlich zu danken.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Privatdozenten
Dr. G. Terplan für die zahlreichen Hinweise
und sein immer freundliches Entgegenkommen.

Lebenslauf

Am 30. Juni 1933 wurde ich als Sohn des Gastwirts und Metzgers August Wellhäuser und seiner Ehefrau Paula, geb. Dennenmoser, in Ravensburg (Württbg.) geboren.

Nach 4 Jahren Volksschule trat ich in das Spohn-Gymnasium ein. 1950 wechselte ich in die Wirtschaftsoberschule über, wo ich 1953 die Reifeprüfung ablegte.

Von 1953 - 1955 absolvierte ich bei Herrn Max Forster in Tettang eine Lehre im Fleischergewerbe, die ich mit der Gesellenprüfung abschloß.

Im Sommer-Semester 1956 war ich an der Staatswissenschaftlichen Fakultät der Universität München immatrikuliert und nach der Zusatzprüfung für Absolventen der Wirtschaftsoberschule begann ich im Wintersemester 1956/57 das Tierärztliche Studium an der Universität München, das ich im August 1961 mit dem Staatsexamen abschloß.

Meine Praktikantenzeit leistete ich bei Herrn Dr. Breuer in Warendorf (Westf.) ab. Am 1. April 1962 bekam ich meine Bestallung als Tierarzt. Seit dem 1. September 1962 bin ich als Assistent am Institut für Nahrungsmittelkunde der Tierärztlichen Fakultät München angestellt.



